

Aus dem Institut für Pathologie
(ehem. Direktor: Prof. Dr. med. Günter Klöppel)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**OPTIMIERUNG EINES ORTHOTOPEN
PANKREASKARZINOMMODELLS UND SEINE ANWENDUNG FÜR
ANTI-ANGIOGENE THERAPIEVERSUCHE**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MAREN RIECHMANN

aus Neumünster

Kiel 2009

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Sipos
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Kalthoff
Tag der mündlichen Prüfung:	30. Juni 2009
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	30. Juni 2009

gez.: Prof. Dr. Siebert

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

In Gedenken an meinen Vater

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1.	PANKREASKARZINOM	1
1.2.	TIERMODELLE	2
1.2.1.	<i>Xenotransplantationsmodell.....</i>	<i>3</i>
1.2.2.	<i>Scid-beige Maustumormodell</i>	<i>4</i>
1.3.	ANGIOGENESE	5
1.4.	ENDOSTATIN.....	7
1.5.	ZIELSETZUNG	8
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1.	ZELLKULTUR	9
2.1.1.	<i>Zelllinien.....</i>	<i>9</i>
2.1.2.	<i>Kultivierung und Passagierung der Zellen</i>	<i>9</i>
2.1.3.	<i>Aufarbeitung der Tumorzelllinien für die Inokulation in die Maus.....</i>	<i>10</i>
2.1.3.1.	<i>Aufarbeitung mittels Kulturmedium RPMI 1640.....</i>	<i>10</i>
2.1.3.2.	<i>Aufarbeitung mittels Matrigel.....</i>	<i>11</i>
2.2.	DIE TIERE	11
2.2.1.	<i>Tierhaltung.....</i>	<i>11</i>
2.2.2.	<i>Narkose der Tiere.....</i>	<i>12</i>
2.2.3.	<i>Orthotope Inokulation/Implantation.....</i>	<i>12</i>
2.2.3.1.	<i>Orthotope Inokulation mittels Kulturmedium RPMI 1640.....</i>	<i>12</i>
2.2.3.1.1.	<i>Gruppeneinteilung nach orthotoper Inokulation mittels Kulturmedium.....</i>	<i>12</i>
2.2.3.2.	<i>Orthotope Implantation mittels Fibrinkleber.....</i>	<i>13</i>
2.2.3.3.	<i>Orthotope Inokulation mittels Matrigel.....</i>	<i>13</i>
2.2.4.	<i>Antagonisierung der Tiere</i>	<i>13</i>
2.2.5.	<i>Gruppeneinteilung und Behandlungsablauf nach orthotoper Inokulation mittels Matrigel.....</i>	<i>14</i>
2.2.6.	<i>Wirkstoffe für die Behandlung.....</i>	<i>15</i>
2.2.6.1.	<i>Behandlung mit Endostatin</i>	<i>15</i>
2.2.6.2.	<i>Behandlung mit Gemcitabin.....</i>	<i>15</i>
2.2.6.3.	<i>Behandlung mit Endostatin und Gemcitabin</i>	<i>15</i>
2.3.	VERABREICHUNG VON BASF LUCONYL BLAU.....	15
2.4.	TÖTUNG UND GEWEBEENTNAHME	16
2.4.1.	<i>Herstellung von Gefrierschnitten.....</i>	<i>16</i>
2.5.	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN UND UNTERSUCHUNGEN	17
2.5.1.	<i>Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung.....</i>	<i>17</i>
2.5.2.	<i>Immunhistochemische Färbetechniken.....</i>	<i>18</i>

2.5.2.1.	APAAP-Methode zum Nachweis von CD 31 (Micro Vessel Density)	18
2.5.2.1.1.	Auswertung der Blutgefäßdichte	19
2.5.2.2.	Ki-67 Immunfärbung mit der Avidin-Biotin-Technik	19
2.5.2.2.1.	Auswertung der Tumorzellproliferation.....	20
2.5.3.	Statistische Analyse	20
3.	ERGEBNISSE	22
3.1.	MAKROSKOPISCHE AUSWERTUNGEN	22
3.1.1.	Wachstumsverteilung von Primärtumoren und Bauchdeckenmetastasen nach der Inokulation mit Kulturmedium RPMI 1640.....	22
3.1.2.	Optimierung der Implantationstechnik: Fibrinkleber versus Matrigel	23
3.1.3.	Wachstumsvergleich von PancTu-I Primärtumoren und Bauchdeckenmetastasen (5x10 ⁵ Zellen mit Matrigel) bei unbehandelten und mit Endostatin, Gemcitabin bzw. Endostatin und Gemcitabin behandelten Versuchstieren (n=5)	23
3.1.3.1.	Tötung nach 14 Tagen (Kontrolle für den Behandlungsbeginn).....	23
3.1.3.2.	Tötung nach 28 Tagen.....	24
3.1.3.3.	Tötung nach 42 Tagen.....	25
3.2.	HISTOLOGISCHE AUSWERTUNGEN	26
3.2.1.	Tumormorphologie anhand von HE-Schnitten	26
3.2.2.	Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 31 Antikörper (Micro Vessel Density)....	26
3.2.2.1.	Tötung nach 14 Tagen.....	26
3.2.2.2.	Tötung nach 28 Tagen.....	26
3.2.2.3.	Tötung nach 42 Tagen.....	27
3.2.3.	Immunhistochemische Färbung mit Anti-Ki-67 Antikörper (Proliferationsmarker)	27
3.2.3.1.	Tötung nach 14 Tagen.....	28
3.2.3.2.	Tötung nach 28 Tagen.....	28
3.2.3.3.	Tötung nach 42 Tagen.....	28
3.2.4.	Effektivität der in vivo Luconyl Blau Applikation.....	29
4.	DISKUSSION	30
4.1.	PRÄKLINISCHE TIERMODELLE	30
4.2.	IMPLANTATIONSTECHNIKEN.....	31
4.3.	ANGIOGENESE	33
4.4.	ENDOSTATIN	35
5.	ZUSAMMENFASSUNG	39
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	41
7.	ANHANG	50
7.1.	LABORMATERIALIEN UND ARBEITSGERÄTE.....	50
7.2.	ZELLKULTUR: MEDIEN UND ZUSÄTZE	51
7.3.	TIERSTALL: HALTUNGSBEDINGUNGEN UND ARBEITSMATERIALIEN	52

7.4.	FÄRBEREAGENZIEEN UND ZUBEHÖR	52
7.5.	TABELLEN FÜR DIE TIERMODELLE	54
7.5.1.	<i>Tumorstolumina (mm³) PancTu-I in Kulturmedium inokuliert.....</i>	54
7.5.2.	<i>Tumorstolumina (mm³) Panc89 in Kulturmedium inokuliert</i>	54
7.5.3.	<i>Tumorstolumina (mm³) PancTu-I in Matrigel inokuliert</i>	55
7.5.4.	<i>Blutgefäßdichte (mm²) im PancTu-I Tumor markiert durch Färbung mit Anti- CD 31 Antikörper</i>	56
7.5.5.	<i>Proliferationsrate (%) im PancTu-I Tumor markiert durch Färbung mit Anti-Ki- 67 Antikörper</i>	57
7.5.6.	<i>Effektivität der in vivo Luconyl Blau Applikation.....</i>	57
7.6.	DIAGRAMME.....	58
7.6.1.	<i>Vergleich der Tumorstolumina im Pankreas (behandelt versus unbehandelt) bei PancTu-I Tumoren (Matrigel).....</i>	58
7.6.2.	<i>Vergleich der Tumorstolumina (Primärtumoren versus Bauchdeckenmetastasen) der PancTu-I Tumoren (Matrigel).....</i>	58
7.6.3.	<i>Blutgefäßdichte der PancTu-I Tumoren (CD 31 Färbung)</i>	59
7.6.4.	<i>Proliferationsrate der PancTu-I Tumoren (Ki-67 Färbung).....</i>	59
7.7.	ABBILDUNGEN.....	60
8.	DANKSAGUNG	62
9.	LEBENS LAUF	63

Abkürzungen

BSA	Bovin Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
°C	Grad Celsius
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetra-acetate
FCS	Fetal Calf Serum
kDa	Kilodalton
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm, mm ² , mm ³	Millimeter, Quadrat-, Kubik-
PBS	Phosphate Buffered Saline
Rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
scid	severe combined immune deficiency
Tab.	Tabelle

V(D)J-Rekombinasesystem	variable, diversity and joining-Rekombinasesystem
x	mal
z. B.	zum Beispiel
$\mu\text{g/g}$	Mikrogramm pro Gramm
$\mu\text{m}, \mu\text{l}$	Mikrometer, -liter

1. Einleitung

1.1. Pankreaskarzinom

Maligne Erkrankungen des Pankreas gehören mit einer Inzidenz von etwa 3 % aller Erkrankungsfälle an bösartigen Neubildungen pro Jahr in allen Altersgruppen eher zu den selteneren Karzinomerkrankungen. Vergleicht man jedoch die Mortalitätsraten, so gehört der Tumor der Bauchspeicheldrüse mit Anteilen von 5,8 % bei Männern und 6,7 % bei Frauen zur vierthäufigsten Krebstodesursache im Jahr 2004 in Deutschland (Robert Koch Institut).

Als eindeutiger Risikofaktor wurde Zigarettenrauchen nachgewiesen. 30-50 % aller Fälle bei Männern sowie 15-20 % der Erkrankungsfälle bei Frauen sind dem Rauchen zuzuschreiben (La Vecchia et al. 1991). Weitere prädisponierende Faktoren werden diskutiert, wie z. B. fett- und proteinreiche Ernährung, chronische Pankreatitis (Klöppel und Maillet 1996) und selten genetische Faktoren.

Tumoren des Pankreas sind kaum therapierbar und weisen daher sehr ungünstige 5-Jahres-Überlebensraten auf, für Männer 6,4 % und für Frauen 7,6 % (Robert Koch Institut). Durch die fehlende Möglichkeit der Früherkennung ist der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nur bei etwa 10-25 % der Patienten resektabel (Murr et al. 1994, De Angelis et al. 2007, Jensen et al. 2008).

Die einzige kurative Therapie besteht in der R0-Resektion des Tumors (weder makroskopisch noch mikroskopisch verbliebener Tumorrest), da man hierbei durchschnittlich von einer 17-monatigen Überlebenszeit ausgehen kann, wobei die 5-Jahres-Überlebenszeit über 10 % beträgt. Weiterhin kann die Prognose postoperativ noch durch eine adjuvante Chemotherapie verbessert werden (Wray et al. 2005). Außerdem besteht auch die Möglichkeit einer Chemoradiotherapie, welche allerdings zwischen den Onkologen in Amerika und Europa sehr umstritten ist (Choti 2004, Neoptolemos et al. 2004).

Hinsichtlich längerer Überlebenszeiten profitieren inoperable Pankreaskarzinom-Patienten in der Regel nicht von einer Chemo- oder Radiotherapie. Allerdings gehört

Gemcitabin (Gemzar), aufgrund seiner Verbesserung der Lebensqualität, mittlerweile zur Standardtherapie bei inoperablen Patienten (Saif 2006, Storniolo et al. 1999). Gemcitabin, ein fluoriniertes Pyrimidinanalogon, wird als inaktive Vorstufe in die Zelle transportiert und mittels Deoxycytidin-Kinase zur aktiven Form phosphoryliert. Nach Aufnahme in den DNA-Strang wird die DNA-Polymerase blockiert und das Zellwachstum gehemmt (Plunkett et al. 1995). In einer 1995 in den Vereinigten Staaten begonnenen 16-monatigen Multicenter-Studie mit 3023 Patienten mit inoperablem Pankreaskarzinom, welche mit Gemcitabin behandelt wurden, lag bei 2380 dieser Patienten die mittlere Überlebenszeit bei 4,8 Monaten und die 12-monatige Überlebenszeit betrug 15 %. Diese Daten sind vereinbar mit den Überlebenszeiten mit Gemcitabin behandelter Patienten bei Burris et al. (5,7 Monate), Casper et al. (5,6 Monate) und Carmichael et al. (6,3 Monate). Weiterhin wurde die Verbesserung der Lebensqualität gemessen: 1. Anhand einer Schmerz-Skala und/oder der Einnahme der jeweiligen Analgetika-Klasse und/oder des Karnofsky-Index oder 2. bei Stabilität der vorangegangenen Parameter musste das Körpergewicht um 7 % gegenüber dem Ausgangsgewicht zugenommen haben. Insgesamt kam es während der 4-Zyklen Gemcitabin-Behandlung über 20 Wochen zu einer kontinuierlichen Verbesserung der Lebensqualität (Storniolo et al. 1999).

Da die gegenwärtigen Therapieprotokolle die Überlebenszeit nicht signifikant verlängern können, ist die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten dringend notwendig. Eine neue Option bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms könnte die anti-angiogene Therapie darstellen.

1.2. Tiermodelle

In der biomedizinischen Forschung werden Tiere, die für menschliche Erkrankungen typische Symptome entwickeln oder die entsprechenden pathologischen Störungen zeigen, als Tiermodelle bezeichnet. Dabei geht man davon aus, dass die biochemischen und physiologischen Grundprozesse bei Säugetieren im Prinzip ähnlich sind.

Tiermodelle eignen sich zur Untersuchung von komplexen physiologischen und pathologischen Veränderungen. Meist verbieten ethisch-moralische Gründe die

Durchführung solcher Studien am Menschen. Außerdem erzielt man durch eine größere Homogenität in den Tiermodellen eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

In der biomedizinischen Forschung werden Tierversuche durchgeführt, um die Vorgänge in unserem Körper besser verstehen zu lernen, um neue Erkenntnisse über Krankheitsursachen und Entstehungsmechanismen, ebenso wie über den Krankheitsverlauf und Behandlungsmöglichkeiten zu finden und um die Wirksamkeit und Sicherheit von Medikamenten gewährleisten zu können.

Für das Verständnis der komplexen Interaktionen im betroffenen Organismus, wie z. B. der Angiogenese oder dem Metastasierungsverhalten von Primärtumoren, ist der Einsatz von in vivo Modellen heutzutage noch unentbehrlich. Und auch die Entwicklung und Testung diagnostischer und therapeutischer Verfahren, wie z. B. der Metabolismus verabreichter Medikamente, ist in in vitro Versuchen nicht nachvollziehbar.

Meistens werden Mäuse und Ratten als Versuchstiere verwendet (Becker 2000). Diese Nagetiere zeichnen sich durch eine schnelle, einfache Reproduktion und ein zügiges Heranwachsen aus, ebenso wie durch eine einfache Handhabung und genügsame Haltungsanforderungen. Außerdem gibt es mittlerweile viele streng durchgezüchtete Linien mit bekanntem genetischem Hintergrund.

1.2.1. Xenotransplantationsmodell

Bei dem Xenotransplantationsmodell handelt es sich um eine xenogene Transplantation, also um eine Übertragung zwischen unterschiedlichen Individuen verschiedener Spezies. Die Xenotransplantation kann dabei so erfolgen, dass der Ort der Explantation mit dem Ort der Implantation übereinstimmt, also orthotop, oder aber heterotop, dann besteht keine örtliche Übereinstimmung.

Weiterhin gibt es bei der Xenotransplantation verschiedene Verfahren. Es besteht die Möglichkeit der subkutanen Injektion von Zelllinien oder aber der subkutanen Transplantation von Primärtumoren. Die Vorteile hierbei sind ein gutes Monitoring sowie eine einfache Applikation. Ein großer Nachteil allerdings ist, dass nicht

annähernd die klinische Situation des Tumorgeschehens widergespiegelt wird, da das Umgebungsmilieu ein anderes ist. Dies beeinflusst wesentlich das Wachstum und Metastasierungsverhalten der Tumoren (Kubota 1994, Tsuzuki et al. 2001).

Bei dem orthotopen Verfahren besteht die Möglichkeit der Inokulation von Zelllinien oder die Transplantation von Primärtumoren. Die Vorteile hierbei sind die örtliche Übereinstimmung und das organspezifische Umgebungsmilieu (Wachstum, angiogenes Potenzial, Metastasierung, eventuell invasives Wachstum). Die Nachteile sind das Operationsrisiko sowie das schwierige und aufwendige Monitoring.

1.2.2. Scid-beige Maustumormodell

Die auf einer spontanen autosomal rezessiven Mutation beruhende schwere kombinierte Immundefizienz (scid = severe combined immune deficiency) wurde 1980 in einem kongenen Mäusestamm C.B.-17/lcr am Fox Chase Center in Philadelphia von Bosma et al. (1983) entdeckt.

Dieses angeborene Krankheitssyndrom wurde zuvor schon bei Neugeborenen (Hirschhorn et al. 1979) und auch bei Araberfohlen (McGuire et al. 1975) beschrieben. Die Ursache der Immundefizienz ist eine Veränderung der „DNA-dependent protein kinase catalytic subunit“ (Bosma et al. 2001). Der Genort dieser Spontanmutation befindet sich auf dem Chromosom 16 (Miller et al. 1995). Das betroffene Gen ist ein Teil des V(D)J-Rekombinasesystems, welches für die Ausbildung funktionaler Immunglobuline und T-Zellrezeptoren verantwortlich ist (Schuler und Bosma 1989). Es kommt zu einer Unterentwicklung der lymphatischen Gewebe mit Fehlen der B- und T-Zellimmunität.

Im April 1993 züchtete Frau Dr. Anne Croy an der University of Guelph (Kanada) die scid-beige Maus. Diese Tiere leiden an einer Doppelmutation, welche sich sowohl auf das „scid“- (keine B- und T-Lymphozyten), als auch auf das „beige“-Gen (geringe natürliche Killerzellaktivität) bezieht (MacDougall et al. 1990). Das „beige“-Gen wurde auf den C.B.-17 scid-Stamm durch Kreuzung zwischen C.B.-17 scid von R.A. Phillips und C57BL/6-bg Mäusen von The Jackson Laboratories übertragen.

Für Xenotransplantationsmodelle werden häufig immundefiziente Tiere eingesetzt, da dadurch die Möglichkeit besteht, fremdes Gewebe ohne Abstoßungsreaktion zu übertragen.

1.3. Angiogenese

Die Angiogenese ist eine wesentliche Voraussetzung für das Wachstum und die Persistenz solider Tumoren und ihrer Metastasen (Folkman 1989).

Ohne Versorgung über das Blutgefäßsystem (avaskuläre Phase) können solide Tumoren nur einen Durchmesser von 1-2 mm erreichen. Ein weiteres Tumorwachstum ist in der Regel nur durch Gefäßeinsprossung/Kapillaraussprossung aus bereits bestehenden Gefäßen möglich (Folkman 1976, 1995). Dies wird durch die Freisetzung von angiogenen und die Herunterregulation von anti-angiogenen Faktoren, die von Tumorzellen, Fibroblasten und Entzündungszellen produziert werden, induziert. Normalerweise stehen die angiogenen und die anti-angiogenen Faktoren bei der Gefäßhomöostase in einem funktionellen Gleichgewicht. Als „angiogenic switch“ wird die Herstellung eines Ungleichgewichtes dieser Faktoren im Tumor zugunsten der Angiogenese bezeichnet (Hanahan und Folkman 1996). Beim Tumorwachstum muss in jedem Fall ein Ungleichgewicht zugunsten pro-angiogener Faktoren verbleiben (Ellis und Fidler 1996).

Ein bedeutsamer angiogener Wachstumsfaktor für die Tumorangiogenese ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der von fast allen soliden Tumoren gebildet wird. Seine Rezeptoren werden vor allem auf Gefäßendothelien in der Nähe des Tumors exprimiert (Folkman 1997). Neben den angiogenen Faktoren konnten auch natürliche anti-angiogene Faktoren nachgewiesen werden, die die Gefäßendothelzellproliferation hemmen (Folkman 1997). Beispiele hierfür wären z. B. die Proteine Angiostatin und Endostatin (O'Reilly et al. 1997). In der postembryonalen Phase eines Organismus ist der Angiogeneseprozess, mit Ausnahme des weiblichen Reproduktionstraktes (Ovulation, Menstruation, Implantation, Schwangerschaft), immer mit pathologischen Prozessen wie Wundheilung oder Tumorwachstum verbunden (Hanahan und Folkman 1996).

Aufgrund dessen ergeben sich durch die Hemmung der Angiogenese attraktive Therapieoptionen, bei denen nur geringfügige Nebenwirkungen zu erwarten sind.

Im Vergleich zu normalen Blutgefäßen sind die neu entstandenen Tumorgefäße undicht und abnormal in Größe und Gestalt (Harris 1997) sowie auch in zellulärer Zusammensetzung und Stabilität (Boehle und Kalthoff 1999). Dies bietet eine weitere Möglichkeit für ein gezieltes therapeutisches Vorgehen gegen die Tumorgefäße, auch „vascular targeting“ genannt. Hierbei werden strukturelle und physiologische Unterschiede zwischen tumorösen und normalen Blutgefäßen ausgenutzt, um eine gezielte Zerstörung der Tumorgefäßstruktur zu erreichen.

Tab.1: Beispiele für endogene Regulatoren der Angiogenese (Pepper 1997, Fidler et al. 1994)

STIMULIERENDE ANGIOGENESEFAKTOREN	
ANGIOGENIN BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR HEPARINASE HEPATOCYTEN GROWTH FACTOR HYPOXIE INTERLEUKIN-8 PLATELET-DERIVED ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR	PLEOTROPIN PROSTAGLANDIN E1, E2 THYMIDINE PHOSPHORYLASE/ PD-ECGF TRANSFORMING GROWTH FACTOR ALPHA UND BETA TUMOR NEKROSE FACTOR ALPHA VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

HEMMENDE ANGIOGENESEFAKTOREN	
ANGIOSTATIN ENDOSTATIN INTERLEUKIN-12 INTERFERON ALPHA UND -BETA PLATELET FACTOR 4	PROLACTIN FRAGMENT PROTAMINE RETINOIDE RIBONUKLEASE INHIBITOR STEROIDE (GLUKOKORTIKOIDE) THROMBOSPONDIN

1.4. Endostatin

Es sind zahlreiche natürliche und synthetische Angiogeneseinhibitoren bekannt (Tab. 1). Darunter Endostatin, ein 20 kDa großes carboxyl-terminales Fragment des Kollagen XVIII, welches von O'Reilly et al. (1997) erstmals aus dem Kulturüberstand von einer murinen Hämangioendotheliomzelllinie EOMA isoliert wurde.

Endostatin entsteht durch die Spaltung einer Ala-His Verknüpfung (Wen et al. 1999) unter anderem durch Matrilysin (MMP-7) (Heljasvaara et al. 2005, Lin et al. 2001).

Kollagen XVIII ist hauptsächlich in der Basalmembran um die Blutgefäße herum lokalisiert (Boehm et al. 1997, O'Reilly et al. 1997, Muragaki et al. 1995). Die Immunhistologie von erwachsenem Mausgewebe zeigt eine bevorzugte Lokalisation in vielen Gefäßwänden, vor allem in denen mit vielen elastischen Fasern (Aorta, große Lungenarterien) und in einigen anderen Basalmembranzonen (Miosge et al. 1999).

In vitro Ergebnisse zeigen, dass Endostatin ein endogener und spezifischer Hemmer der Endothelzellproliferation, -migration und -angiogenese ist (Dhanabal et al. 1999), da es keinen signifikanten Effekt auf ruhende Endothelzellen, Tumorzellen oder nichtepitheliale Zelltypen (einschließlich Fibroblasten und glatte Muskelzellen) hat (Dhanabal et al. 1999, O'Reilly et al. 1997).

Die systemische Therapie mit Endostatin bewirkte im Maustumormodell eine nahezu komplette Suppression der vom Tumor induzierten Angiogenese. Die Primärtumoren gingen bis auf eine mikroskopisch kleine Läsion zurück, mit daraus resultierendem Ruhezustand des Tumors (O'Reilly et al. 1997). Für die Zeit, in der die Mäuse behandelt wurden, kam es zu keinem erneuten Tumorwachstum, keinem Anzeichen einer Medikamentenresistenz und keiner Toxizität (Wen et al. 1999, O'Reilly et al. 1997).

Ein möglicher Wirkungsmechanismus des Endostatins ist zum einen die Apoptoseinduktion durch Caspase-3 Aktivierung und zum anderen eine Herunterregulierung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL in Endothelzellen (Dhanabal et al. 1999).

Trotz der hoffnungsvollen präklinischen Studien, hat Endostatin in den ersten klinischen Studien an Patienten, mit inoperablen metastasierten Tumoren, keine wesentliche Wirkung auf die Tumorprogression gezeigt (Whitworth 2006). Allerdings gab es auch Patienten, die kein Tumorwachstum mehr aufwiesen beziehungsweise bei einigen Tumoren kam es sogar zu geringfügigen Schrumpfungen. In den letzten Jahren ist eine lösliche Form des Endostatins hergestellt worden (Folkman 2006, Whitworth 2006), die sich oral verabreicht, in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika in einer ersten Studie als effektiv erwies (Kerbel 2006, Whitworth 2006).

1.5. Zielsetzung

Bei dieser Dissertation geht es um die Optimierung bereits bestehender orthotoper Pankreaskarzinommodelle für die Anwendung präklinischer Versuche sowie um die Demonstration der Anwendung des optimierten Modells beispielhaft in einem anti-angiogenen/zytostatischen Therapieversuch.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zelllinien

Verwendet wurden 2 etablierte humane Pankreaszelllinien.

Die Zelllinie PancTu-I stammt aus dem Primärtumor eines Pankreaskarzinoms und wurde von der Arbeitsgruppe um Professor M. von Bülow in Mainz etabliert (Moore et al. 2001).

Die Zelllinie Panc89, auch als T3M4 bezeichnet, stammt von Lymphknotenmetastasen eines Pankreaskarzinoms und wurde von der Arbeitsgruppe um T. Okabe in Japan etabliert (Okabe et al. 1983).

Beide Zelllinien sind gering differenziert und gut charakterisiert (Sipos et al., Virchows Archiv, 2003).

2.1.2. Kultivierung und Passagierung der Zellen

Durchgeführt wurden die Arbeiten unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank mit vertikalem Luftstrom (Köttermann 8511).

Die Tumorzellen wurden in Flüssigstickstoff gelagert. Um die Zellen in Kultur nehmen zu können, wurden die bei -196°C eingefrorenen Zellportionen für 2-3 Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und bei 1000 Rpm (Drehzahl/Minute) für 2 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit Nährmedium resuspendiert und in die Kulturflaschen ausgesät.

Zur Kultivierung der Pankreas-Adenokarzinom-Zelllinien PancTu-I und Panc89 wurde das Kulturmedium RPMI 1640 mit Glutamax I (L-Alanyl-Glutamin) unter Zusatz von 10 % FCS verwendet. Die Zellen wurden bei 5 % CO₂ und 95 % Luft in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre in einem Zellkulturwärmeschrank bei 37°C kultiviert. Sie

wuchsen einschichtig und adhärent in Zellkulturflaschen (Größe T-75 cm²) mit Filterdeckel (Porengröße 0,2 µm).

Mikroskopische Untersuchungen auf Wachstumsverhalten und Kontamination der Zellen fanden im zweitägigen Abstand statt. Ab einem Zellrasen von 80-90 % Konfluenz wurden die Kulturen mit einer adäquaten Menge an vorgewärmten (37°C) Kulturmedium in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt. Für die Passagierung wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellkultur einmal mit RPMI ohne Zusatz von FCS vorgewaschen (Neutralisierung des restlichen FCS) und anschließend mit einfach konzentrierter Trypsin-EDTA-Lösung für 10-15 Minuten im Zellkulturwärmeschrank inkubiert.

Nach Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde eine gleiche Menge Medium hinzugefügt, um das Trypsin zu neutralisieren. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt, bei 1000 Rpm (Drehzahl/Minute) für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. In einem Verhältnis von 1:5 wurden die Zellen geteilt und erneut ausgesät.

Mittels eines kommerziell erhältlichen, auf PCR (Polymerase Chain Reaktion) basierenden Mykoplasmen-Testkit wurden die Zellen vor dem Einfrieren und vor jedem Tierversuch auf eine Kontamination mit Mykoplasmen, gemäß Hersteller, getestet. Für die Versuche wurden lediglich mykoplasmenfreie Kulturen verwendet.

2.1.3. Aufarbeitung der Tumorzelllinien für die Inokulation in die Maus

2.1.3.1. Aufarbeitung mittels Kulturmedium RPMI 1640

Für die orthotope Inokulation wurden jeweils 1×10^6 Vektor-transduzierte Zellen der Zelllinien PancTu-I und Panc89 in 20 µl Kulturmedium aufgenommen. Dazu wurden die zu injizierenden Zellen trypsiniert, mit entsprechender Menge Medium abzentrifugiert und nach Resuspension durch anschließende Zellzählung in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer auf die jeweilige Konzentration eingestellt. Nach erneutem Abzentrifugieren (3 Minuten bei 1000 Rpm und 10 Minuten bei 800 Rpm) sowie sterilem Absaugen des Überstandes, wurden jeweils 20 µl Kulturmedium dazu

aliquotiert. Die Zellsuspension wurde in Insulinspritzen mit einem geringen Totraumvolumen blasenfrei aufgezogen.

Für die subkutane Inokulation und die anschließende orthotope Transplantation des gewachsenen Tumorgewebes mittels Fibrinkleber wurden 4×10^6 Zellen der Zelllinie PancTu-I in oben beschriebener Weise aufbereitet.

2.1.3.2. Aufarbeitung mittels Matrigel

Nach dem sterilen Absaugen des Überstandes und Lagerung auf Eis, wurde zu 5×10^5 Zellen der Zelllinie PancTu-I 20 µl kaltes Matrigel (auf Eis) dazu pipettiert (vorherige Aufarbeitung siehe 2.1.3.1.). Anschließend erfolgte das Aufziehen der Zellsuspension und Lagerung bei unter 0°C auf Eis.

2.2. Die Tiere

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an weiblichen scid-beige Mäusen des Stammes C.B.-17/lcrHsd scid/scid beige/beige durchgeführt. Die Tiere stammten von der Firma Charles River in Sulzfeld. Zu Versuchsbeginn waren die Mäuse 5 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht zwischen 12,5 und 19,6 g. Die Tiere hatten den Standard SPF (spezifiziert pathogenfrei). Die Versuche wurden durch die ärztliche Tierschutzkommission genehmigt.

2.2.1. Tierhaltung

Die Mäuse wurden in einem S1-Labor bei 22-26°C und 40-60 % relativer Luftfeuchtigkeit in Laminar Flow Schränken untergebracht, in denen ca. 20-mal in der Stunde ein kompletter Luftaustausch erfolgte. Sie wurden in Gruppen zu maximal 5 Tieren in autoklavierten Makrolonkäfigen des Typs III mit Filtertops gehalten. Wasser und bestrahltes Futter standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Ein Wechsel der autoklavierten Einstreu fand einmal wöchentlich unter sterilen Bedingungen statt.

Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse mindestens 10 Tage lang nach der Lieferung akklimatisiert. Täglich wurden die Tiere auf ihr Allgemeinbefinden und eventuelle

Wundheilungsstörungen post operativ kontrolliert und zweimal wöchentlich wurden sie gewogen. Die „Richtlinien zur Haltung und Nutzung von Laboratorien“ des National Institutes of Health (NIH), USA sowie alle geltenden Gesetze wurden streng befolgt.

2.2.2. Narkose der Tiere

Für die Narkose wurde eine Kombination aus Dormicum, Dormitor und Fentanyl unter folgender gewichtsabhängiger Dosierung verwendet: Dormicum (Midazolam, Hoffmann La Roche, Grenzach-Whylen) 5 mg/kg Körpergewicht, Dormitor (Medetomidin, Pfizer, Karlsruhe) 0,5 mg/kg Körpergewicht, Fentanyl (Fentanyl, Janssen-Cilag, Neuss) 0,05 mg/kg Körpergewicht. Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Die Narkosedauer betrug 20 bis 30 Minuten.

2.2.3. Orthotope Inokulation/Implantation

2.2.3.1. Orthotope Inokulation mittels Kulturmedium RPMI 1640

Für die orthotope Inokulation wurden die Mäuse mit einer Kombinationsnarkose intraperitoneal wie oben beschrieben narkotisiert und über Wundverschlußstreifen an den Extremitäten fixiert. Das Abdomen der Mäuse wurde für die anschließende mediane Laparotomie rasiert und desinfiziert. Der Magen wurde mit dem Pankreas vorverlagert und mittels Watteträgern fixiert. Die 1×10^6 Vektor-transduzierten Zellen der Zelllinien PancTu-I und Panc89 wurden langsam in den Pankreaskopf injiziert. Anschließend wurden Magen und Pankreas wieder zurückverlagert. Die Inzision wurde mit einem resorbierbaren Faden mittels einer fortlaufenden intraperitonealen und einer fortlaufenden Bauchdeckennaht verschlossen.

2.2.3.1.1. Gruppeneinteilung nach orthotoper Inokulation mittels Kulturmedium

Es wurden insgesamt 30 scid-beige Mäuse mit 1×10^6 Vektor-transduzierten Zellen der Zelllinie PancTu-I mittels Kulturmedium orthotop inokuliert und in Gruppen zu 2 bis 5 Tieren eingeteilt. Die Tötungen fanden 10 Tage (5 Tiere), 20 Tage (5 Tiere),

25 Tage (5 Tiere), 30 Tage (4 Tiere), 35 Tage (5 Tiere), 41 Tage (2 Tiere) und 45 Tage (4 Tiere) nach der Inokulation statt.

Weiterhin wurden insgesamt 18 scid-beige Mäuse mit 1×10^6 Vektor-transduzierten Zellen der Zelllinie Panc89 mittels Kulturmedium orthotop inokuliert und in Gruppen zu 3 bzw. 5 Tieren eingeteilt. Die Tötungen fanden 15 Tage (5 Tiere), 25 Tage (5 Tiere), 35 Tage (3 Tiere) und 45 Tage (5 Tiere) nach der Inokulation statt.

2.2.3.2. Orthotope Implantation mittels Fibrinkleber

Die subkutane Inokulation von 4×10^6 Zellen der Zelllinie PancTu-I erfolgte nach dem Rasieren und Desinfizieren in die linke Flanke des Versuchstieres. Postoperativ fand zweimal wöchentlich eine Gewichtskontrolle statt. Weiterhin wurde das Tier täglich auf das Allgemeinbefinden sowie das palpable Tumorwachstum kontrolliert. Nach 8 Tagen war ein 2×1 mm messender solider Tumor am Implantationsort tastbar, mit einer Größenprogredienz auf 9×6 mm nach 26 Tagen, so dass die Gewebeentnahme über einen Hautschnitt sowie stumpfer Präparation in Narkose erfolgte. Anschließend wurde das Tumorgewebe auf 1 mm^3 große Gewebestücke zurechtgeschnitten und 5 weiteren scid-beige Mäusen nach erfolgter Laparotomie retropankreatisch mittels Fibrinkleber implantiert.

2.2.3.3. Orthotope Inokulation mittels Matrigel

Es wurden 5×10^5 Zellen der Zelllinie PancTu-I in $20 \mu\text{l}$ kaltem Matrigel in einer Insulinspritze aufgezogen und bis zur Inokulation auf Eis gelagert (siehe Versuchsablauf 2.2.3.1.). Die Zellen wurden langsam in den Pankreaskopf injiziert. Danach wurde die Kanüle für ca. 2 Minuten in dieser Stellung belassen, um eine Konsolidierung des Matrigels abzuwarten. Anschließend wurden Magen und Pankreas wieder zurückverlagert.

2.2.4. Antagonisierung der Tiere

Im Anschluss an die Operation wurden die Mäuse antagonisiert, um ein schnelleres Aufwachen der Tiere zu ermöglichen. Dadurch sollte eine übermäßige Auskühlung

vermieden werden. Zudem wurden die Mäuse während der Nachschlafphase mittels einer Wärmelampe warm gehalten, beobachtet und die Augen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung beträufelt. Zur Antagonisierung wurden folgende gewichtsabhängige Dosierungen subkutan verwendet: Antisedan (Atipamezol, Pfizer, Karlsruhe) 2,5 mg/kg Körpergewicht, Naloxon (Naloxon, CuraMed Pharma, Karlsruhe) 1,2 mg/kg Körpergewicht und Anexate (Flumazenil, Hoffmann La Roche, Grenzach-Whylen) 0,5 mg/kg Körpergewicht.

2.2.5. Gruppeneinteilung und Behandlungsablauf nach orthotoper Inokulation mittels Matrigel

Um die Behandlungserfolge beweisen und differenzieren zu können, wurden 15 Versuchstiere in 3 Gruppen zu je 5 Tieren als unbehandelte Kontrollgruppe gehalten. Die Tötungszeitpunkte wurden 14, 28 und 42 Tage nach der orthotopen Inokulation mit 5×10^5 Vektor-transduzierten Zellen der Zelllinie PancTu-I mit Matrigel festgelegt.

Für die Behandlung mit Endostatin, Gemcitabin sowie Endostatin und Gemcitabin wurden jeweils 10 Versuchstiere in 2 Gruppen zu je 5 Tieren gehalten. Mit der Therapie wurde 14 Tage nach der orthotopen Inokulation mit 5×10^5 Vektor-transduzierten Zellen der Zelllinie PancTu-I mit Matrigel begonnen, da zu diesem Zeitpunkt bereits ein etabliertes Tumorwachstum bestand (Tab. 7.5.3.). Den wachen Versuchstieren wurde jeweils die entsprechende Wirkstoffmenge gewichtsbezogen über eine Insulinspritze mit geringem Totraumvolumen entsprechend appliziert. Insgesamt wurde die Behandlung für die eine Gruppe über einen Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt (Lebensdauer 42 Tage), mit einer Zwischentötung der jeweils anderen Gruppe nach 14-tägiger Behandlung (Lebensdauer 28 Tage), um die Tumorgroße sowie die eventuelle Infiltration bzw. Metastasierung nach der Hälfte der Behandlungszeit im Vergleich zum Behandlungsende beurteilen und dokumentieren zu können.

2.2.6. Wirkstoffe für die Behandlung

2.2.6.1. Behandlung mit Endostatin

Das Endostatin wurde rekombinant hergestellt von der Arbeitsgruppe um Prof. Neumaier (Institut für Klinische Chemie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg), wie bereits beschrieben von Böhme et al. 2001 bei der Behandlung des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms im Xenotransplantationsmodell. Täglich wurde den Mäusen eine Endostatin-Konzentration von 20 µg/g Körpergewicht abwechselnd subkutan in die rechte oder linke Flanke appliziert.

2.2.6.2. Behandlung mit Gemcitabin

Es wurde Gemzar 200 mit dem Wirkstoff Gemcitabinhydrochlorid (Lilly Pharma, Gießen) verwendet. Dieses enthält als arzneilich wirksamen Hauptbestandteil 200 mg Gemcitabin. Zweimal die Woche wurde eine Gemcitabin-Konzentration von 12 µg/g Körpergewicht den Mäusen intraperitoneal injiziert.

2.2.6.3. Behandlung mit Endostatin und Gemcitabin

Den Mäusen wurde täglich eine Endostatin-Konzentration von 20 µg/g Körpergewicht subkutan in die Flanke und zweimal die Woche eine Gemcitabin-Konzentration von 12 µg/g Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

2.3. Verabreichung von BASF Luconyl Blau

Um die Anzahl der durchbluteten Tumorgefäße darstellen zu können, haben wir einen Farbstoff in vivo appliziert. Verwendet wurde Luconyl Blau 7080 von der Firma BASF. Es wurde eine 40%ige Lösung hergestellt, indem 1,2 ml physiologische Kochsalzlösung mit 0,8 ml Luconyl Blau vermischt wurde. Dies ergab im Ausstrich auf dem Objektträger eine feine Blaukörnung. Pro Versuchstier wurden 10 Units in einer Spritze aufgezogen (40 Units = 1 ml). In den ersten Versuchen wurde diese isotonische Blaulösung den Tieren nach Laparotomie in Narkose, 10 Minuten vor der Tötung in die Vena portae gespritzt. Später ging man dazu über, die Lösung

10 Minuten vor der Tötung in die Schwanzvene und letztendlich dann intrakardial zu applizieren.

2.4. Tötung und Gewebeentnahme

Die Tötung erfolgte mittels manueller zervikaler Dislokation zu einem definierten Zeitpunkt, um das Tumorwachstum und das Metastasierungsverhalten vergleichen zu können.

Die vorzeitige Tötung erfolgte bei erkennbaren Schmerzen, einem fortschreitenden Gewichtsverlust sowie anderen sichtbaren Leiden.

Vor der Tötung wurden die Tiere ein letztes Mal gewogen. Nach der Tötung, Laparotomie und Eröffnung des Peritoneums wurde die Organsituation makroskopisch untersucht in Bezug auf Lage des Primarius, Infiltration und Metastasen. Die Organe wurden dann einzeln entnommen und der Primärtumor gewogen. Die Bauchdeckenmetastasen sowie der Pankreastumor wurden vermessen und mittels der Formel für eine Rotationsellipse ($\text{Volumen in mm}^3 = \text{Länge} \times \text{Breite}^2 \times 0,52$) wurde das Tumolvolumen berechnet (Tomayko und Reynolds 1989). Insgesamt wurden Pankreas, Lunge, Leber, beide Nieren, zum Teil die Milz und bei makroskopischem Metastasenbefall bzw. bei Infiltration wurden Anteile vom Magen-Darm-Trakt entnommen. Jedes Organ kam für sich in ein beschriftetes Kryo-Röhrchen zusammen mit ca. 1 ml Kryomedium. Die Kryo-Röhrchen wurden anschließend in Flüssigstickstoff schockgefroren und in einer Gefriertruhe bei -80°C gelagert.

2.4.1. Herstellung von Gefrierschnitten

Die Proben wurden mit dem Kryotom auf eine Dicke von 4 bis 5 µm bei einer Schneidetemperatur von -15 bis -20°C geschnitten und mit beschichteten Objektträgern aufgenommen. Danach wurden sie 12 Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.5. Histologische Färbungen und Untersuchungen

Die bei -20°C gelagerten Gewebeschnitte wurden eine Stunde vor der Färbung bei Raumtemperatur aufgetaut und entsprechend der Fragestellung gefärbt.

2.5.1. Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Die Präparate wurden mit Hilfe eines HE-Färbeautomaten (Staining Master-HE-Färbeautomat, Bavimed, Birkenau) den Anleitungen des Herstellers folgend gefärbt. In dem Färbeautomat durchlaufen die Schnitte folgende Behandlungen:

Wässern in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimal 100%iger Alkohol, zweimal 90%iger Alkohol, einmal 70%iger Alkohol, einmal Aqua destilata)
Hämalaun (Kernfärbung) nach Meyer: 10 Minuten
Bläuung der Kerne in heißem Leitungswasser: 10 Minuten
Spülen mit Aqua destilata
Eosin (1%ig, Zytoplasmafärbung): 1 Minute
Spülen in Leitungswasser
Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (einmal mit Aqua destilata, einmal 70%iger Alkohol, zweimal 90%iger Alkohol, zweimal 100%iger Alkohol)
Zweimal Xylol-Bad
Die gefärbten Präparate wurden dann mit Depex [®] und einem Deckglas eingedeckt.

2.5.2. Immunhistochemische Färbetechniken

2.5.2.1. APAAP-Methode zum Nachweis von CD 31 (Micro Vessel Density)

Bei der APAAP-Methode handelt es sich um eine alkalische Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Technik, mit der man beispielsweise immunhistochemisch Gefäßendothelzellen rot anfärben kann, zum Nachweis kleinster intratumoraler Blutgefäße (Microvessels).

Für diese Methode wird (nach Cordell et al. 1984) ein Primärantikörper (der monoklonale Antikörper Klon 390 gegen Maus-CD 31 wurde aus der Ratte gewonnen), ein Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Ratte Immunglobulin, Z0494, DAKO), ein APAAP-Komplex (D0488, DAKO) sowie eine Entwicklungslösung benötigt.

Hierfür wurden die Kryoschnitte 10 min in Aceton bei Raumtemperatur fixiert. Die Gewebeareale wurden nach dem Trocknen der Objektträger mit einem Silikon-Stift PAP-Pen eingekreist. Anschließend erfolgte das Aufbringen der nachfolgenden Komponenten:

Blocking mit Kaninchen Normalserum 1:5	15 min
Primärantikörper CD 31 1:500 in 2 % Milchpulver	45 min
Sekundärantikörper Anti-Ratte 1:100 in 2 % Milchpulver	10 min
APAAP-Ratte 1:100 in 2 % Milchpulver	10 min
Sekundärantikörper Anti-Ratte 1:100 in 2 % Milchpulver	10 min
APAAP-Ratte 1:100 in 2 % Milchpulver	10 min
Entwicklung mit hausgemachtem Entwickler (oder Fast Red (DAKO) 5 min)	30 min
Hämalaun (zur Gegenfärbung)	5-10 min

Nach jedem Gang 3x in Tris-Puffer waschen

Nachfolgend wurden die Präparate mit Depex [®] und Deckglas eingedeckt.
--

2.5.2.1.1. Auswertung der Blutgefäßdichte

Zunächst wurden die Schnitte lichtmikroskopisch auf die Dichte der positiv gefärbten Blutgefäße untersucht. Das Gefäßendothel stellt sich rot und die Kerne stellen sich nach der Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer blau dar. Es wurden jeweils 3 Bereiche mit erhöhter Neovaskularisation, sogenannte „Hot Spots“ ausgewählt (Weidner et al. 1991) und die positiv gefärbten Gefäße, in dem mit einem 40x/0,65 Objektiv gelegenen Bereich (0,2 mm²), wurden gezählt. Anschließend wurde aus diesen 3 Werten ein Mittelwert gebildet. Die normale Blutgefäßdichte wurde nicht mitgezählt.

2.5.2.2. Ki-67 Immunfärbung mit der Avidin-Biotin-Technik

Dieser murine monoklonale Antikörper (IgG1, Klon MIB-1) weist das nukleäre, zellproliferationsassoziierte Protein Ki-67 nach, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und M Phase) exprimiert wird. MIB-1 zeigt auf allen proliferierenden Zellen eine starke Kernfärbung. Die Anwendungsverdünnung war 5%ig in BSA/PBS. Der sekundäre Antikörper war im DAKO[®] Animal Research Kit enthalten. Die Gewebeareale der für diese Färbungen vorgesehenen Präparate wurden mit einem Silikonstift umkreist.

Blockierung mit Peroxidase (0,03 % H ₂ O ₂)	20 min
Dreimaliges Waschen mit Tris-Puffer	
Mit Avidin überschichten	15 min
Dreimaliges Waschen mit Tris-Puffer	
Blocken mit Biotin	15 min

Dreimaliges Waschen mit Tris-Puffer	
Überschichtung der Präparate mit dem primären Antikörper (Ki-67/MIB-1 CytoDEATH), der vor der Färbereaktion mit den Reagenzien 2 und 3 aus dem DAKO [®] AR-Kit für 45 min inkubiert wurde (Biotinulierung).	30 min
Ein Präparat pro Objektträger wurde als Negativkontrolle ohne den primären Antikörper inkubiert.	
Dreimaliges Waschen mit Tris-Puffer	
Inkubation mit dem DAKO [®] AR-Kit (Reagenz 4, Streptavidin-HRP)	30 min
Färbeentwicklung mit Peroxidase-H ₂ O ₂ -Diaminobenzidin (DAB)-Substratlösung	15 min

DAB als Substrat der Peroxidase führte nach enzymatischem Abbau zur Braunfärbung des Gewebes, so dass die abgelaufene Immunreaktion nachgewiesen und lokalisiert werden konnte. Nach dem Waschen der Präparate mit Aqua dest. wurde zur Kerndarstellung mit Hämatoxilin gefärbt und 10 min unter fließendem Wasser gebläut. Anschließend wurden die Präparate getrocknet und mit Depex[®] und einem Deckglas eingedeckt.

2.5.2.2.1. Auswertung der Tumorzellproliferation

Der Bereich mit den meisten angefärbten Tumorzellkernen (nach dem „Hot Spot“ Prinzip, Weidner et al. 1991) wurde im Gewebe ermittelt und das Sichtfeld unter einem 60x/0,80 Objektiv für die Anzahl der positiven (braunen) und der negativen (blauen) Tumorzellkerne ausgezählt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl der Kerne ausgerechnet.

2.5.3. Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Microsoft Excel bearbeitet und mit Hilfe der Computersoftware SPSS 10.1 (Statistical Package for the Social Science,

Chicago, Illinois, USA) ausgewertet. Es wurde in der deskriptiven Statistik zur Analyse der Messergebnisse für die jeweilige Anzahl n der Versuchstiere, den verschiedenen Zelllinien und Tötungszeitpunkten der jeweilige arithmetische Mittelwert, das Minimum und Maximum sowie die Standardabweichung des Tumorzvolumens berechnet.

Darauf basierend wurden die Berechnungen der p -Werte, mittels der nichtparametrischen Tests nach Kruskal-Wallis für mehrere unabhängige Stichproben bzw. nach dem Mann-Whitney-U-Test für 2 unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Stichproben bezogen sich jeweils auf das vorhandene Tumorzvolumen der Versuchstiere in mm^3 . Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zugrunde gelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Makroskopische Auswertungen

3.1.1. Wachstumsverteilung von Primärtumoren und Bauchdeckenmetastasen nach der Inokulation mit Kulturmedium RPMI 1640

Vergleicht man das in vivo Wachstumsverhalten bezogen auf den Primärtumor und die Bauchdeckenmetastasen der mit 1×10^6 Zellen der Zelllinie PancTu-I und Panc89 orthotop inokulierten Versuchstiere, dann zeigte sich, dass im Verlauf das Tumolvolumen der Bauchdeckenmetastasen das der Primärtumoren um ein Vielfaches übersteigt.

Bei Tötung der mit PancTu-I inokulierten Tiere an den Tagen 10, 20, 25, 30 und 35 lag ein größeres mittleres Tumolvolumen der Primärtumoren ($32,6/78,5/117/370,8/424,2 \text{ mm}^3$) gegenüber den Bauchdeckenmetastasen ($4,2/1,9/41,8/289,5/202,3 \text{ mm}^3$) vor. Bereits am Tag 10 waren bei 1 von 5 Tieren sowie am Tag 20 bei 3 von 5 Tieren Bauchdeckenmetastasen vorzufinden. Bei den fortgeschrittenen Tumoren (Tag 41 und 45) zeigte sich ein mittleres Tumolvolumen der Bauchdeckenmetastasen von $2374,9$ bzw. $722,2 \text{ mm}^3$ im Gegensatz zu $732,2$ bzw. $415,4 \text{ mm}^3$ beim Pankreastumor (Tab. 7.5.1.). Die Tumorangehrate bei allen Tieren betrug 100 %.

Bei Tötung der mit Panc89 inokulierten Tiere am Tag 15 zeigte sich ein mittleres Tumolvolumen des Pankreas von $0,5 \text{ mm}^3$ bei nicht vorhandenen Bauchdeckenmetastasen sowie am Tag 25 ein mittleres Pankreastumolvolumen von $1,5 \text{ mm}^3$ mit Bauchdeckenmetastasen bei 2 von 5 Tieren mit einem mittleren Tumolvolumen von $0,1 \text{ mm}^3$. Am Tag 35 sowie 45 lag ein mittleres Tumolvolumen der Bauchdeckenmetastasen von $664,9$ bzw. $2666,3 \text{ mm}^3$ vor, im Gegensatz zu $3,7$ bzw. $197,2 \text{ mm}^3$ des Primarius (Tab. 7.5.2.).

3.1.2. Optimierung der Implantationstechnik: Fibrinkleber versus Matrigel

Um das vermehrte Auftreten artifizieller Bauchdeckenmetastasen zu vermeiden, haben wir zwei weitere Implantations-/Inokulationsmethoden getestet. Bei 5 Tieren wurde die Tumorimplantation von subkutan gezüchtetem Tumorgewebe mittels Fibrinkleber (siehe 2.2.3.2.) vorgenommen. Die Tumorangehrate betrug 4/5 Tiere (80 %). Es lag ein mittleres Tumolvolumen der Bauchdeckenmetastasen von 49,4 mm³ und des Primarius von 682 mm³ bei der Tötung am Tag 42 vor. Außerdem wiesen die Tiere Metastasen vor allem im Bereich des Magens (2 Tiere), Mesenteriums (2 Tiere) sowie Leber, Milz und Duodenum (jeweils 1 Tier) auf.

Gemäß 2.2.3.3. wurden bei 5 Versuchstieren die Zellen mittels Matrigel inokuliert. Die Tumorangehrate betrug 100 %. Bei einem Tier kam es bei der Inokulation zu einer leichten Pankreasblutung und bei einem anderen ist etwas Zellsuspension herausgelaufen. Diese Tiere zeigten bei der Tötung nach 56 Tagen kleine Metastasen im Bereich der Leber und Bauchdecke. Das mittlere Tumolvolumen der Bauchdeckenmetastasen war mit 29,9 mm³ um 39,6 % geringer als das der Gruppe nach der Fibrinkleberimplantation, obwohl die Tiere 2 Wochen länger lebten. Dafür lag das mittlere Tumolvolumen in dem Pankreas mit 1454 mm³ deutlich höher als bei der Vergleichsgruppe.

Aufgrund dieser günstigen Ergebnisse hinsichtlich der geringen eingriffsbedingten Metastasierung wurde die Inokulationsmethode mittels Matrigel für die weiteren Versuche eingesetzt.

3.1.3. Wachstumsvergleich von PancTu-I Primärtumoren und Bauchdeckenmetastasen (5x10⁵ Zellen mit Matrigel) bei unbehandelten und mit Endostatin, Gemcitabin bzw. Endostatin und Gemcitabin behandelten Versuchstieren (n=5)

3.1.3.1. Tötung nach 14 Tagen (Kontrolle für den Behandlungsbeginn)

Der erste Tötungszeitpunkt in der Kontrollgruppe fand 14 Tage nach der Inokulation statt sowie zeitgleich mit dem Behandlungsbeginn der anderen 3 Gruppen. So ließ

sich dokumentieren, dass bereits nach 2 Wochen ein mittleres Tumolvolumen von 46,7 mm³ im Pankreas mit einer Standardabweichung von 37,3 mm³ sowie bei 1/5 Versuchstieren Bauchdeckenmetastasen (4,2 mm³) vorlagen (Tab. 7.5.3.).

3.1.3.2. Tötung nach 28 Tagen

Bei der Kontroll-Gruppe (unbehandelt) betrug der Mittelwert des Pankreas-Tumorzumens 146,2 mm³ mit einer Standardabweichung von 51,9 mm³. Das Tumorzumens der unbehandelten Gruppe war signifikant größer, als in den 3 behandelten Gruppen (Mann-Whitney-U-Test $p=0,028/0,021/0,009$).

Das mittlere Tumorzumens des Pankreas sowie die Standardabweichung (mm³) betrugen bei den mit Endostatin behandelten Tieren 67 mm³ und 31,6 mm³ bei den mit Gemcitabin behandelten Versuchstieren 54,6 mm³ und 43,5 mm³ sowie bei der Gruppe mit der Kombinationsbehandlung aus Endostatin und Gemcitabin 25,7 mm³ und 14,6 mm³ (Tab. 7.5.3., Diagramm 7.6.1.).

Bei der mit Endostatin behandelten Gruppe bestand ein nicht signifikanter Unterschied hinsichtlich des Tumorzumens zu der mit Gemcitabin behandelten Gruppe (Mann-Whitney-U-Test $p=0,249$) sowie ein signifikant größerer Unterschied (Mann-Whitney-U-Test $p=0,028$) zu der mit Endostatin und Gemcitabin behandelten Gruppe. In der mit Gemcitabin behandelten Gruppe gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-U-Test $p=0,462$) zu der mit Endostatin und Gemcitabin behandelten Gruppe (Tab. 7.5.3., Diagramm 7.6.1.).

Die Bauchdeckenmetastasen traten bei weniger als der Hälfte der Tiere auf und waren vergleichsweise klein. In der unbehandelten Gruppe war mit einem mittleren Tumorzumens von 94,1 mm³ bei 2 von 5 Tieren das größte Metastasenwachstum zu verzeichnen, gefolgt von der mit Endostatin behandelten Gruppe mit 57,4 mm³ bei 3 von 5 Tieren. Das geringste mittlere Tumorzumens der Bauchdeckenmetastasen wies mit 2,3 mm³ bei 2 von 5 Tieren die mit Gemcitabin behandelte Gruppe auf, gefolgt von der mit Gemcitabin und Endostatin behandelten Gruppe mit einem mittleren Tumorzumens von 10,1 mm³ bei 2 von 5 Tieren (Tab. 7.5.3., Diagramm 7.6.2.).

3.1.3.3. Tötung nach 42 Tagen

Bei der Kontroll-Gruppe (unbehandelt) betrug der Mittelwert des Pankreas-Tumorzvolumens $300,7 \text{ mm}^3$ mit einer Standardabweichung von $289,4 \text{ mm}^3$. Zu der mit Endostatin behandelten Gruppe gab es keinen signifikanten Größenunterschied mehr (Mann-Whitney-U-Test $p=0,675$). Das Tumorzvolumen der unbehandelten Gruppe war signifikant größer, als das in der mit Gemcitabin (Mann-Whitney-U-Test $p=0,009$) sowie Gemcitabin und Endostatin behandelten Gruppe (Mann-Whitney-U-Test $p=0,009$).

Das mittlere Tumorzvolumen des Pankreas sowie die Standardabweichung betrugen bei den mit Endostatin behandelten Tieren $224,3 \text{ mm}^3$ und $159,4 \text{ mm}^3$ bei den mit Gemcitabin behandelten Versuchstieren 28 mm^3 und $9,7 \text{ mm}^3$ sowie bei der Gruppe mit der Kombinationsbehandlung aus Endostatin und Gemcitabin $12,1 \text{ mm}^3$ und $12,8 \text{ mm}^3$ (Tab. 7.5.3., Diagramm 7.6.1.).

Bei der mit Endostatin behandelten Gruppe bestand ein signifikant größerer Unterschied hinsichtlich des Tumorzvolumens zu der mit Gemcitabin (Mann-Whitney-U-Test $p=0,009$) sowie der mit Endostatin und Gemcitabin behandelten Gruppe (Mann-Whitney-U-Test $p=0,009$). In der mit Gemcitabin behandelten Gruppe gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-U-Test $p=0,074$) zu der mit Endostatin und Gemcitabin behandelten Gruppe (Tab. 7.5.3., Diagramm 7.6.1.).

Die Bauchdeckenmetastasen traten bei $\frac{1}{3}$ der Tiere auf und waren vergleichsweise klein. In der unbehandelten Gruppe war mit einem mittleren Tumorzvolumen von $222,6 \text{ mm}^3$ bei 3 von 5 Tieren das größte Metastasenwachstum zu verzeichnen, gefolgt von der mit Endostatin behandelten Gruppe mit $70,7 \text{ mm}^3$ bei 2 von 5 Tieren. Sowohl die mit Gemcitabin als auch die mit Gemcitabin und Endostatin behandelten Tiere wiesen kein Metastasenwachstum auf (Tab. 7.5.3., Diagramm 7.6.2.).

3.2. Histologische Auswertungen

3.2.1. Tumormorphologie anhand von HE-Schnitten

Beide Zelllinien zeigten lichtmikroskopisch das Bild eines gering differenzierten, solide wachsenden Tumors. Die Tumorzellen bildeten große kompakt gelagerte Zellnester. Man sah am Rande des Tumors kleine infiltrierende Tumorzellkomplexe sowie Einzelzellinfiltrationen. Gelegentlich kam es zu Lymphgefäßeinbrüchen. Die Zellkerne waren pleomorph und hyperchromatisch. Das Kern-Zytoplasmaverhältnis war deutlich zugunsten des Kernes verschoben. Mitosen und apoptotische Zellen waren häufig. Zentrale Tumornekrosen führten gelegentlich zu zystisch imponierenden Tumoren. Die Lebermetastasen wiesen ein isomorphes histologisches Bild auf. Insgesamt entsprach die Histologie der Maustumoren der von einem niedrig differenzierten humanen duktalem Adenokarzinom.

3.2.2. Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD 31 Antikörper (Micro Vessel Density)

Es wurden jeweils 3 Bereiche erhöhter Neovaskularisation, sogenannte „Hot Spots“ ausgewählt, die positiv gefärbten Gefäße in diesem Bereich gezählt und ein Mittelwert daraus gebildet. Alle behandelten orthotopen PancTu-I Tumoren wiesen eine geringere Gefäßdichte als die unbehandelte Kontrollgruppe auf (Diagramm 7.6.3.).

3.2.2.1. Tötung nach 14 Tagen

Die unbehandelte Gruppe zeigte eine durchschnittliche Gefäßdichte von $44,9/0,2 \text{ mm}^2$ mit einer Standardabweichung von $5,9 \text{ mm}^2$.

3.2.2.2. Tötung nach 28 Tagen

Bei der Kontroll-Gruppe (unbehandelt) betrug die durchschnittliche Gefäßdichte $73,1/0,2 \text{ mm}^2$ mit einer Standardabweichung von $13,5 \text{ mm}^2$. Damit war sie signifikant größer, als in den 3 behandelten Gruppen (Mann-Whitney-U-Test $p=0,002$).

Die durchschnittliche Gefäßdicke sowie die Standardabweichung betrugen bei der mit Endostatin behandelten Gruppe $42,7/0,2 \text{ mm}^2$ und $14,2 \text{ mm}^2$ bei den mit Gemcitabin behandelten $35,4/0,2 \text{ mm}^2$ und $12,9 \text{ mm}^2$ sowie bei der Gruppe mit der Kombinationsbehandlung aus Endostatin und Gemcitabin $30,7/0,2 \text{ mm}^2$ und $6,6 \text{ mm}^2$ (Tab. 7.5.4.).

Bei den behandelten Gruppen bestand untereinander kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der durchschnittlichen Gefäßdicke (Mann-Whitney-U-Test $p=0,327/0,175/0,624$) (Tab. 7.5.4., Diagramm 7.6.3.).

3.2.2.3. Tötung nach 42 Tagen

Bei der Kontroll-Gruppe (unbehandelt) betrug die durchschnittliche Gefäßdicke $71,9/0,2 \text{ mm}^2$ mit einer Standardabweichung von $30,8 \text{ mm}^2$. Damit war sie bis auf eine Ausnahme signifikant größer als in den anderen behandelten Gruppen (Mann-Whitney-U-Test $p=0,014/0,025$).

Die durchschnittliche Gefäßdicke sowie die Standardabweichung betrugen bei der mit Endostatin behandelten Gruppe $47,8/0,2 \text{ mm}^2$ und $26,7 \text{ mm}^2$ bei den mit Gemcitabin behandelten $26,7/0,2 \text{ mm}^2$ und $3,9 \text{ mm}^2$ sowie bei der Gruppe mit der Kombinationsbehandlung aus Endostatin und Gemcitabin $24,8/0,2 \text{ mm}^2$ und $9,7 \text{ mm}^2$ (Tab. 7.5.4.).

In der mit Endostatin behandelten Gruppe bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Gefäßdicke zur unbehandelten Gruppe (Mann-Whitney-U-Test $p=0,251$), ebenso wie bei den behandelten Gruppen untereinander (Mann-Whitney-U-Test $p=0,221/0,18/1,0$) (Tab. 7.5.4., Diagramm 7.6.3.).

3.2.3. Immunhistochemische Färbung mit Anti-Ki-67 Antikörper (Proliferationsmarker)

Nach Ermittlung des Bereiches mit den meisten angefärbten Tumorzellkernen im Gewebe und Auszählung der Anzahl der positiven (braunen) und negativen (blauen) Tumorzellkerne, wurde anschließend der prozentuale Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl (von 200 Zellen) ausgerechnet. Die Proliferationsrate der

behandelten Tumoren war bis auf eine Ausnahme deutlich geringer als in der Kontrollgruppe (Diagramm 7.6.4.).

3.2.3.1. Tötung nach 14 Tagen

Die unbehandelte Gruppe zeigte eine durchschnittliche Proliferationsrate von 63 % mit einer Standardabweichung von 4,9 %.

3.2.3.2. Tötung nach 28 Tagen

Bei der Kontroll-Gruppe (unbehandelt) betrug die durchschnittliche Proliferationsrate 72,5 % mit einer Standardabweichung von 3,6 %. Damit war sie signifikant größer, als in den 3 behandelten Gruppen (Mann-Whitney-U-Test $p=0,001$) (Diagramm 7.6.4.).

Die durchschnittliche Proliferationsrate sowie die Standardabweichung betrugen bei der mit Endostatin behandelten Gruppe 55,7 % und 6,5 % bei den mit Gemcitabin behandelten Tieren 48,3 % und 9,7 % sowie bei der Gruppe mit der Kombinationsbehandlung aus Endostatin und Gemcitabin 40,8 % und 6,2 % (Tab. 7.5.4.).

In der mit Endostatin behandelten Gruppe bestand ein signifikant größerer Unterschied zu der mit Endostatin und Gemcitabin behandelten Gruppe (Mann-Whitney-U-Test $p=0,016$). Im Übrigen bestand untereinander kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der durchschnittlichen Gefäßdichte (Mann-Whitney-U-Test $p=0,347/0,117$) (Diagramm 7.6.4.).

3.2.3.3. Tötung nach 42 Tagen

Bei der Kontroll-Gruppe (unbehandelt) betrug die durchschnittliche Proliferationsrate 71,4 % mit einer Standardabweichung von 6,3 %. Damit war sie bis auf eine Ausnahme signifikant größer als in den anderen behandelten Gruppen (Mann-Whitney-U-Test $p<0,016/0,025$).

Die durchschnittliche Proliferationsrate sowie die Standardabweichung betrugen bei der mit Endostatin behandelten Gruppe 71,1 % und 3,3 % bei den mit Gemcitabin behandelten 55,2 % und 6,7 % sowie bei der Gruppe mit der Kombinationsbehandlung aus Endostatin und Gemcitabin 48 % und 8,3 % (Tab. 7.5.4.).

In der mit Endostatin behandelten Gruppe bestand kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Gruppe (Mann-Whitney-U-Test $p=0,806$), aber ein signifikant größerer Unterschied zu der mit Gemcitabin sowie der mit Endostatin und Gemcitabin behandelten Gruppe (Mann-Whitney-U-Test $p=0,014/0,034$). In der mit Gemcitabin behandelten Gruppe gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zu der mit Endostatin und Gemcitabin behandelten Gruppe (Mann-Whitney-U-Test $p=0,297$) (Diagramm 7.6.4.).

3.2.4. Effektivität der in vivo Luconyl Blau Applikation

Insgesamt wurde 93 Versuchstieren der Luconyl Blaufarbstoff verabreicht. Bei den ersten Tieren wurde die Luconyl Blaulösung in die Vena portae injiziert, was sich als sehr aufwendig gestaltete, da erst das gesamte Darmpaket aus dem Körper herausverlagert werden musste, um dann die Vena portae zu identifizieren. Makroskopisch gelang bei der Hälfte der Tiere eine gute Blaufärbung, das bedeutet, dass die gesamte Maus sich blau färbte, nachdem der Farbstoff durch den tierischen Kreislauf zirkuliert war. Histologisch waren allerdings nur wenige Gefäße bei den Tieren blau markiert. Anschließend wurde der Farbstoff über die Schwanzvene injiziert. Hierbei wurde bei mehr als der Hälfte der Tiere makroskopisch und histologisch ein gutes Ergebnis erzielt, bei einfachem Zugang, aber ziemlich schwieriger Applikation in die dünne Vene im Bereich der Schwanzwurzel. Deshalb gingen wir dazu über, die Luconyl Blaulösung nach Palpation intrakardial zu injizieren. Dies erzeugte bei vielen Tieren makroskopisch, aber nur bei wenigen mikroskopisch ein positives Ergebnis, bei einfachem Zugang sowie einfacher Applikation. Insgesamt gesehen zeigten nur 29 % der 93 Versuchstiere histologisch eine glaubwürdige Anfärbung der Gefäße bei makroskopisch überdurchschnittlich (60 %) gutem Ergebnis (Tab. 7.5.6.).

4. Diskussion

Um weiterführende Aussagen über die anti-angiogene Wirkung von Endostatin auf das duktales Adenokarzinom des Pankreas treffen zu können, sollte in dieser Arbeit zum einen die optimale Transplantationstechnik der Zellen herausgefunden werden und zum anderen sollte die alleinige Wirkung von Endostatin gegenüber Gemcitabin bzw. in Kombination mit diesem überprüft werden, um einen wirkungsvollen Therapieansatz in der Behandlung des Pankreaskarzinoms zu erzielen.

Die Untersuchungen wurden am Tiermodell durchgeführt, da dieses für das Verständnis der komplexen Interaktionen, wie z. B. der Angiogenese oder dem Metastasierungsverhalten von Primärtumoren, heutzutage noch unentbehrlich ist.

4.1. Präklinische Tiermodelle

Grundsätzlich wird bei den präklinischen Tiermodellen zwischen Mutations- und Transplantationsmodellen unterschieden. Die Mutationsmodelle werden unterteilt in spontane und induzierte Modelle. Bei letzterem können die Mutationen durch Bestrahlung beziehungsweise bestimmte Chemikalien ausgelöst werden oder es werden Knock-Out-Tiere (Ausschaltung bestimmter Gene/-sequenzen) oder transgene Tiere (Erbgutträger einer anderen Spezies) hergestellt. Letztere sind immunkompetent, wobei die zufällig auftretenden Tumoren und deren Entwicklung sowie Metastasierung bei intaktem Immunsystem der humanen Situation am nächsten kommt. Allerdings stehen dem ein immenser Herstellungsaufwand mit dementsprechenden Kosten sowie ein zeitlich nicht definiertes Tumorstadium gegenüber. Zum Modell der Spontanmutation gehört auch die Nacktmaus (Nude-Mouse) welche Anfang der 60er Jahre in Glasgow erstmals auftrat. Es handelt sich um eine haarlose, thymusaplastische Maus mit kurzer Überlebenszeit und vermindertem Körperwachstum (Flanagan 1966). Infolge des fehlenden Thymus kann sie keine funktionsfähigen T-Lymphozyten produzieren und ist bei normal entwickelten B-Lymphozyten zu einer Abstoßung von Fremdgewebe nur vermindert in der Lage (Rygaard 1969). Weiterhin ist auch die scid-Maus (Fehlen der B- und T-

Zellimmunität) oder die scid-beige Maus (Fehlen der B- und T-Zellimmunität und geringere natürliche Killerzellaktivität) durch eine Spontanmutation entstanden.

Das häufiger angewendete Transplantationsmodell unterteilt man in syngene (Zellen gleicher Spezies) und xenogene (Zellen unterschiedlicher Spezies) Modelle. Bei letzterem werden immundefiziente Tiere eingesetzt, um eine Abstoßungsreaktion auf artfremde Zellen durch das Immunsystem zu vermeiden. Diese Gefahr besteht bei den syngen Modellen nicht, da z. B. beim Mausmodell nur Zellen von Mäusen gleicher Spezies verwendet werden, allerdings ist dies auch ein Nachteil, da es sich für Untersuchungen an humanen Zellen/Geweben nicht eignet. Für unsere Versuche haben wir uns für das Xenotransplantationsmodell mittels scid-beige Mäusen entschieden, weil die angewendeten Zelllinien gut charakterisiert sind, die Angehrate hoch sowie die Reproduzierbarkeit gut ist, bei vergleichsweise einfacher Handhabung und tragbaren Kosten.

4.2. Implantationstechniken

Bei den Implantationstechniken unterscheidet man zwischen der orthotopen (der Ort für die Injektion oder Gewebetransplantation ist identisch mit dem Originalgewebe) sowie der heterotopen/ektopen (keine örtliche Übereinstimmung) Transplantation. Diese können durchgeführt werden mittels Zellsuspension oder Gewebefragmenten. Es besteht bei der ektopen Transplantation z. B. die Möglichkeit der subkutanen Injektion von Pankreaszelllinien oder der subkutanen Transplantation von Primärtumoren. Aufgrund der einfachen Durchführung sowie dem gut messbaren Tumorwachstum (Wachstumsverläufe, -kurven) im Verlauf, vor allem auch bei Behandlungsmodellen, finden diese Modelle eine häufige Anwendung. Bei der orthotopen Transplantation besteht die Möglichkeit der Inokulation von Pankreaszelllinien ins Pankreas oder der Koinokulation (Tumorzelllinien, Fibroblasten, Endothelzellen) sowie der Implantation von Pankreastumorgewebe mittels Fibrinkleber, Nahttechnik oder durch Mikrochirurgie (Hotz et al. 2001, 2003).

Bei der orthotopen Implantation mittels Fibrinkleber handelt es sich um eine länger dauernde Methode, da die entsprechenden Zelllinien erst vorgezüchtet und subkutan inokuliert werden müssen. Anschließend muss eine gewisse Zeitdauer aufgewendet

werden, bis der subkutane Tumor eine entsprechende Größe erreicht hat, um ihn zu reseziieren, zerkleinern und dann letztendlich den eigentlichen Versuchstieren zu implantieren. Ein weiterer großer Nachteil dieser Methode besteht darin, dass man nicht genau weiß, wie viele Tumorzellen sich in dem zu implantierenden Gewebefragment von 1 mm³ Größe befinden. Diese Gewebestücke wurden dann mit Fibrinkleber retropankreatisch befestigt. Hier zeigt sich ein weiterer Nachteil der Methode, da die Zellen nicht direkt in das Pankreas eingebracht werden konnten. Wahrscheinlich traten bei dieser Versuchsgruppe auch infolgedessen gehäuft Metastasen im Bereich von Magen, Mesenterium, Leber, Milz und Duodenum auf. Die Tumorangehrate betrug nur 4/5 Tieren (80 %) im Gegensatz zu einer 100%igen Angehrate bei den anderen Gruppen. In anderen Studien zeigten sich bei dieser Technik Erfolgsraten von 100 % (Mohammad et al. 1998).

Der orthotopen Inokulation wurde der Vorzug gegeben, da die Pankreaszelllinien im organspezifischen Umgebungsmilieu wachsen, dort Angiogenese induzieren und eventuell Metastasen bilden oder invasiv wachsen können und somit eine bessere Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit zum humanen Pankreaskarzinom besteht. Bei der orthotopen Inokulation mittels Kulturmedium kam es bei den Versuchstieren gehäuft zur Bildung von Bauchdeckenmetastasen. Bei der Zelllinie PancTu-I lagen schon zum ersten Tötungszeitpunkt bei einigen Tieren Bauchdeckenmetastasen vor, welche am Versuchsende 2-3-mal so groß waren wie die Primärtumoren. Bei der Zelllinie Panc89 lagen zwar erst später Bauchdeckenmetastasen vor, allerdings waren diese schon zu einem früheren Zeitpunkt im Verhältnis wesentlich größer als die Primärtumoren, so dass wir die weiterführenden Versuche mit der Zelllinie PancTu-I durchgeführt haben. Diese gehäufte Bildung von Bauchdeckenmetastasen ist am ehesten operationstechnisch bedingt sowie durch die engen räumlichen Verhältnisse im Situs der Maus. Diese artifizielle Metastasenbildung in der Bauchdecke ist unerwünscht, da sie sicherlich das Überleben der Tiere verkürzt und der humanen Situation nicht entspricht. Beim humanen Pankreaskarzinom kommt es selten zu Bauchdeckenmetastasen, da die wichtigsten Orte bei der Metastasierung das Lokalrezidiv und Leber- sowie Peritonealmetastasen sind (Heinemann et al. 2001, Kato et al. 2001).

Bei der orthotopen Inokulation mittels Matrigel zeigten sich im Verhältnis zum Primarius weniger und kleinere Bauchdeckenmetastasen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Gefahr des Rauslaufens der orthotop injizierten Zellen, wie in den Versuchen mit Kulturmedium mittels dem fester werdenden Matrigel weitgehend vermieden werden konnte, was zu einem deutlichen Rückgang der artifiziellen Bauchdeckenmetastasen beitrug. Hierbei handelt es sich um einen großen Vorteil bei der Inokulation mittels Matrigel, da sie am ehesten der humanen Situation entspricht und z. B. auch eine bessere in vivo Bildgebung ermöglicht, da ansonsten durch die großen Bauchdeckenmetastasen die eigentliche Größe des Primarius nicht klar abgrenzbar wäre. Ein Nachteil ist das schnelle Tumorwachstum, wodurch es frühzeitig zu Komplikationen und zu einer geringen Fernmetastasierung kommt. Weiterhin ist die Handhabung des Matrigels zum Teil ziemlich aufwendig, da man immer darauf achten muss, dass die Temperatur von der Zellaufbereitung bis zur Inokulation im Minusbereich liegt, da ansonsten das Matrigel konsolidieren und für den Versuch unbrauchbar werden würde.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass man mit der etablierten Inokulationstechnik mit Matrigel eine wesentliche Verbesserung des Tumormodells hinsichtlich der Tumorprogression und klinischer Relevanz erreicht hat, die auch dadurch deutlich wird, dass die Methode routinemäßig bei Mausexperimenten im Klinikum eingesetzt wird (Schniewind et al. 2007, Schniewind et al. 2006, Tepel et al. 2006).

4.3. Angiogenese

Die Neubildung von Blutgefäßen ausgehend von bereits existierenden Gefäßen wird als Angiogenese bezeichnet und ist eine wesentliche Voraussetzung für die Tumorentstehung, wie Wachstum, Invasion oder Metastasierung. Demnach stellt die anti-angiogene Therapie einen vielversprechenden Ansatz bei der Tumorbehandlung dar. Außerdem bietet sie gegenüber konventionellen zytostatischen, immunologischen oder biologischen Therapien mehrere theoretische Vorteile. Angriffspunkte bei der anti-angiogene Therapie sind nicht die Tumorzellen selbst, welche erst durch Penetration der Umgebung erreicht werden können, sondern die einfacher zugänglichen, tumorversorgenden Gefäßendothelzellen, die vom Blutstrom aus gut erreichbar sind (Baxter et al. 1991, 1992). Ein weiterer Vorteil besteht darin,

dass Endothelzellen normalerweise genetisch stabil sind und mit einer Resistenzentwicklung gegen Medikamente, wie bei den genetisch instabileren Tumorzellen, nicht zu rechnen ist (Boehm et al. 1997, Keshet und Ben-Sasson 1999). Ohne bzw. ohne ausreichende Angiogenese würde der Tumor in ein Ruhestadium übergehen, nicht metastasieren und nur wenige Zellen würden zum Apoptoseausgleich proliferieren (Folkman 1995). Da auch Metastasen von der Angiogenese abhängen, sind auch die Metastasen einer anti-angiogenen Therapie zugänglich, die sich einer kurativen chirurgischen Therapie entzogen haben (Fidler und Ellis 1994). Die konventionellen Therapien mittels Bestrahlung oder Zytostatika richten sich gegen Tumorzellen in der Proliferationsphase. Tumorzellen, die sich in der G₀-Phase befinden, entgehen somit der Behandlung. Die Wirksamkeit der Therapie wird durch eine hohe Mitoserate der Tumorzellen begünstigt. Da im Organismus auch andere Gewebearten einen hohen Zellumsatz aufweisen, stellen sie einen nicht gewollten Angriffspunkt, mit den daraus resultierenden Nebenwirkungen bei der Bestrahlung oder Zytostatikatherapie, dar. Bei der anti-angiogenen Therapie sind Nebenwirkungen wie Knochenmarkssuppression, gastrointestinale Beschwerden oder Haarverlust infolge der Selektivität gegenüber den Endothelzellen in proliferierenden Blutgefäßen nicht zu erwarten (Folkman 1996). Weiterhin kam es bei einigen experimentellen anti-angiogenen Therapieansätzen zu einer einheitlichen Hemmung des Tumorwachstums, unabhängig von der Wachstumsstufe, Tumorzellheterogenität sowie der histologischen Tumorart (Folkman 1996, 1998).

Ein generelles Problem ist die Übertragbarkeit von tierexperimentellen Daten auf den Menschen, vor allem wenn es sich um subkutane Xenograftmodelle handelt, bei denen die Tumoren innerhalb von wenigen Wochen sehr groß werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Angiogenese in diesen Tumoren stärker ausgeprägt ist, als in vielen humanen Tumoren. Dieses generelle Problem zeigt sich auch durch die stark unterschiedlichen Behandlungserfolge in präklinischen Modellen und frühen klinischen Studien. Das beste Beispiel ist das Scheitern der Endostatin-Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden (Whitworth 2006), trotz vielversprechender tierexperimenteller Therapieerfolge (O'Reilly et al. 1997).

4.4. Endostatin

Endostatin ist ein 20 kDa großes C-terminales Fragment des Kollagen XVIII, welches hauptsächlich in der Basalmembran von Blutgefäßen lokalisiert ist. Dabei handelt es sich um einen endogenen Angiogenesehemmer, der erstmals 1997 von O'Reilly aus dem Kulturüberstand einer murinen Hämangioendotheliomzelllinie isoliert wurde. Es hemmt vor allem die Endothelzellproliferation in vitro sowie die Angiogenese und das Tumorwachstum in vivo (O'Reilly et al. 1997). Endostatin hemmt das Wachstum von 65 unterschiedlichen Tumortypen und modifiziert 12 % des humanen Genoms zur Runterregulation der pathologischen Angiogenese ohne Nebenwirkungen (Folkman 2006).

Menschliches Endostatin hemmt die Migration der Endothelzellen, wohingegen das Endostatin der Mäuse sowohl die Migration als auch den Zellzyklus der Endothelzellen in der G₁-Phase hemmt (Hanai et al. 2002, Kuo et al. 2001, Rehn et al. 2001). Der Grund für diesen Unterschied ist bisher unklar. Das menschliche Endostatin bindet an viele Oberflächenproteine von Zellen, welche Heparansulfate, Proteoglykane, Tropomyosine (MacDonald et al. 2001), Glypicans (Karumanchi et al. 2001), VEGFR-2 Rezeptoren (KDR/flk-1) (Kim et al. 2002) und Integrine (Sudhakar et al. 2003, Rehn et al. 2001) enthalten. Obgleich für die Wirkung von humanem Endostatin über Mediatoren viele verschiedene interzelluläre Wege identifiziert wurden, hat man bis jetzt keinen funktionellen Rezeptor gefunden, der die Wirkung von humanem Endostatin über einen definierten Signalweg vermittelt (Hansma et al. 2005, Sudhakar et al. 2003). Weiterhin zeigte sich, dass die therapeutische Wirkung von rekombinantem Endostatin eine biphasische, u-förmige Verlaufskurve bei der Anwendung in vitro sowie in vivo hatte (Celik et al. 2005).

Im Tiermodell führte die systemische Therapie mit Endostatin bei Mäusen zu einer fast vollständigen Unterdrückung der vom Tumor induzierten Angiogenese. Während des Behandlungszeitraumes gab es keinen Hinweis auf Tumorprogression, Medikamentenresistenz oder unerwünschte Nebenwirkungen (Boehm et al. 1997, O'Reilly et al. 1997). In der Phase I Studie bestätigte Folkman 1999, dass es sich um ein sicheres Medikament ohne Nebenwirkungen handeln würde. Allerdings zeigten sich nur kleine oder keine Effekte auf die Tumorprogression (Eder et al. 2002). Auch weitere Behandlungen mit rekombinantem Endostatin zeigten bei Patienten mit

fortgeschrittenen neuroendokrinen Pankreastumoren in einer Phase II Studie nicht die erhofften Erfolge (Kulke et al. 2006).

Trotz der enttäuschenden klinischen Ergebnisse, gibt es weitere Bemühungen eine Endostatin-Therapie zu etablieren. Vor kurzem wurde eine oral einnehmbare lösliche Form des Endostatins (Endostar) in China hergestellt (Xu et al. 2007, Ling et al. 2007). Mit Endostar wird das Konzept der metronomischen Therapie von R. Kerbel verwirklicht, welches eine kontinuierliche, geringdosierte anti-angiogene und zytostatische Therapie propagiert (Kerbel 2006).

In unserer Versuchsserie zeigte Endostatin als Monotherapie nur kurzfristig (nach 14 Tagen) einen hemmenden Effekt auf das Tumorstadium. Die Tumore unter der Gemzar- und Kombinationstherapie zeigten keine Größenzunahme, die Tumorstadien sind sogar nach 28-tägiger Behandlung zurückgegangen. Die Unterschiede zwischen den Therapieerfolgen mit der Gemcitabin-Monotherapie und Kombinationstherapie waren nicht signifikant, allerdings war die Kombinationstherapie nach vierwöchiger Behandlung tendenziell erfolgreicher ($p=0.074$). Wir haben angenommen, dass die Kombinationstherapie einen stärkeren, vielleicht sogar einen synergistischen Effekt zeigen wird. Die Wertung dieses Ergebnisses ist durch zwei Tatsachen erschwert:

1. Die Gemcitabin-Monotherapie ist in Mäusen aus bisher unbekannten Gründen viel effektiver, als bei Menschen. Die Gemcitabin-Dosis wurde ursprünglich nach einer in vivo Gemcitabin-Titration so festgelegt, dass man bei einer geringen Dosierung auch noch einen signifikanten Effekt erwarten konnte (Müerköster, nicht publiziert). Die Dosis entsprach einem Zehntel der Dosis, die bisher als vergleichbar mit der humanen Therapie galt (Bruns et al. 2000), so dass man einen synergistischen Effekt hätte darstellen können.

2. Die Tumoren unter der Kombinations- und Gemcitabin-Therapie sind so geschrumpft oder klein geblieben, dass trotz einer mikroskopischen Ausmessung der Tumorstadien, ein signifikanter Unterschied bei einer Versuchsgruppe $n=5$ aus statistischen Gründen kaum zu erwarten ist. Größere Gruppen waren wegen der limitierten Menge an Endostatin leider nicht möglich. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Endostatin allein kurzfristig das Tumorstadium hemmt

und tendenziell in Kombination mit Gemcitabin einen additiven Effekt auf das Tumorwachstum ausübt.

Die durchschnittliche Gefäßdichte in den behandelten Gruppen war, bis auf die Endostatin behandelte Gruppe am Versuchsende, wesentlich kleiner als in der unbehandelten Gruppe. Dieses Ergebnis war bei den mit Endostatin behandelten Tieren zu erwarten, allerdings ist ein solcher Effekt unter zytostatischer Therapie eher überraschend. Die folgenden Wirkmechanismen könnten dafür erklärend sein. Einige chemotherapeutische Wirkstoffe zeigen anti-angiogene Eigenschaften, durch Hemmung der Endothelzellproliferation, -migration und Kapillarenbildung. Außerdem kommt es bei der Hemmung von Proliferation und Migration in den Endothelzellen zu einem Mangel an adhäsiven Kontakten mit der Matrix und untereinander. Dies macht sie zum einen empfänglicher für Zellgifte mit daraus resultierenden höheren Apoptoseraten, zum anderen könnte die Störung der Angiogenese die Reparatur nach der Zellteilung und die vermehrte Gefäßpermeabilität behindern und dies könnte dazu führen, dass der Tumor vermehrt den zytotoxischen Medikamenten ausgesetzt ist. Somit sind Tumorzellen vermehrt angreifbar für die schädlichen Effekte der Chemotherapie, besonders wenn die zytotoxischen Substanzen in einer geringen Dosis gegeben werden. Daher erscheint ein koordiniertes Herangehen an die verschiedenen tumorassoziierten Zelleigenschaften mit dem Ziel einer ausgeprägten Hemmung des Tumorwachstums eine vielversprechende Strategie (Wu et al. 2005).

Bei den behandelten Gruppen war die durchschnittliche Proliferationsrate, bis auf die mit Endostatin behandelte Gruppe am Versuchsende, wesentlich kleiner als in der unbehandelten Gruppe. Die antineoplastische Wirkung von Gemcitabin wird durch die Zellzyklushemmung begründet. Dahingegen ist ein direkter antiproliferativer Effekt durch die Endostatin-Therapie unwahrscheinlich. Die mögliche Erklärung für die proliferationshemmende Wirkung von Endostatin liegt in der Senkung der Blutgefäßdichte und die dadurch ausgelöste verminderte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Tumore (Neri und Bicknell 2005, Tozer et al. 2005).

Die antineoplastische Wirkung von Angiogenesehemmern und Zytostatika ist unterschiedlich, darum wirken die verschiedenen Therapien in der Kombination stärker als einzeln (Saif 2006). Das Ergebnis bestätigt das therapeutische Potenzial

einer Kombination aus einer anti-angiogenen Substanz und einem Zytostatikum, indem die verschiedenen Wirkmechanismen auf unterschiedliche Zellpopulationen (Endothelzellen/Tumorzellen) im Tumor ausgeübt werden. Auch die Kombination direkter (Endostatin) und indirekter (SU5416) anti-angiogener Wirkstoffe zeigte sich in vitro und in vivo effektiver als die Einzelgaben (Abdollahi et al. 2003). Die Zukunft liegt sicherlich in der trimodalen Therapie (Nieder et al. 2006).

5. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Optimierung bereits bestehender orthotoper Transplantationstechniken von Pankreaskarzinomzelllinien in Tiermodellen. Die optimierten präklinischen Mausmodelle wurden in einer Versuchserie eingesetzt, in die der Effekt einer anti-angiogenen (Endostatin) Behandlung, einer zytostatischen (Gemcitabin) Behandlung sowie die Kombination dieser Therapien untersucht wurde.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die klassische Inokulationsmethode der Zellen in das Pankreas (Tumorzellen in Kulturmedium) weiterentwickelt, da sich oft artifizielle Metastasen in der Bauchdecke und im Peritoneum nach dieser Inokulationstechnik ausbildeten und somit die Auswertung von Tumorwachstum und spontaner Metastasierung erschwert haben. Zwischen den zwei untersuchten Implantationstechniken, der orthotopen Implantation von subkutan gezüchteten Tumorfragmenten und der Inokulation von Tumorzellen in Matrigel, wurde der zweiten Methode Vorzug gegeben, da zum einen die Anzahl der eingebrachten Tumorzellen besser zu kontrollieren war und zum anderen die Pankreaszelllinien im organspezifischen Umgebungsmilieu wuchsen, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit zum humanen Pankreaskarzinom bestand.

Bei der orthotopen Inokulation mittels Matrigel zeigten sich im Vergleich mit der ursprünglichen Methode weniger und kleinere artifizielle Bauchdeckenmetastasen bei gleich gebliebener hundertprozentiger Tumorangehrate, so dass mit der neu etablierten Inokulationstechnik mit Matrigel eine wesentliche Verbesserung des Tumormodells hinsichtlich der Tumorprogression und der klinischen Relevanz erreicht wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine anti-angiogene Behandlungsversuchserie mit Endostatin und Gemcitabin mit Hilfe der etablierten Mausmodelle durchgeführt. Die Hemmung der Tumorangiogenese stellt eine wichtige Therapieoption dar, die mittlerweile Einzug in den klinischen Alltag gefunden hat.

In unserer Versuchsserie zeigte Endostatin als Monotherapie nach 14 Behandlungstagen einen hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum, der

allerdings zum Endpunkt der Serie (28 Tage) nicht mehr zu beobachten war. Unter der Gemcitabin- und Kombinationstherapie kam es zu keiner Größenzunahme oder Metastasierung der Tumore. Die Unterschiede zwischen den Therapieerfolgen mit der Gemcitabin-Monotherapie und Kombinationstherapie waren nicht signifikant, allerdings war die Kombinationstherapie nach vierwöchiger Behandlung tendenziell erfolgreicher.

Die immunhistochemische Untersuchung der Gefäßdichte wies eine Reduzierung der Gefäßdichte sowohl in den durch Endostatin als auch durch Gemcitabin behandelten Gruppen auf, zeigte aber keinen synergistischen Effekt in der Kombination beider Substanzen. Parallel mit der Verringerung der Gefäßdichte, nahm ebenfalls in allen Gruppen, mit Ausnahme der mit Endostatin behandelten Gruppe am Ende der Versuchsreihe, die Proliferationsrate der Tumorzellen ab.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Endostatin allein kurzfristig das Tumorwachstum hemmt und tendenziell in Kombination mit Gemcitabin einen additiven Effekt auf das Tumorwachstum ausübt. Das Ergebnis bestätigt prinzipiell das therapeutische Potenzial einer Kombination aus einer anti-angiogenen Substanz und einem Zytostatikum im Pankreaskarzinom, indem die verschiedenen Wirkmechanismen auf unterschiedliche Zellpopulationen im Tumor ausgeübt werden.

6. Literaturverzeichnis

Abdollahi A, Lipson KE, Sckell A, Zieher H, Klenke F, Poerschke D, Roth A, Han X, Krix M, Bischof M, Hahnfeldt P, Grone HJ, Debus J, Hlatky L, Huber PE (2003) Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res.* 63(24):8890-8898.

Baxter LT, Jain RK (1991) Transport of fluid and macromolecules in tumors. *Microvasc Res* 41:5–23.

Baxter LT, Yuan F, Jain RK (1992) Pharmacokinetic analysis of the perivascular distribution of bifunctional antibodies and haptens: comparison with experimental data. *Cancer Res* 52:5838–44.

Boehle AS, Kalthoff H (1999) Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbeck's Arch Surg* 384:133-140.

Boehle AS, Kurdow R, Schulze M, Kliche U, Sipos B, Soondrum K, Ebrahimnejad A, Dohrmann P, Kalthoff H, Henne-Bruns D, Neumaier M (2001) Human Endostatin inhibits growth of human non-small-cell lung cancer in a murine xenotransplant model. *Int. J. Cancer*: 94:420–428.

Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390:404-407.

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 30:527-530.

Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, Portera CA, Tsan R, McConkey DJ, Evans DB, Abbruzzese JL, Hicklin DJ, Radinsky R (2000) Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res.* 6(5):1936-48.

Celik I, Surucu O, Dietz C, Heymach JV, Force J, Hoschele I, Becker CM, Folkman J, Kisker O (2005) Therapeutic efficacy of Endostatin exhibits a biphasic dose-response curve. *Cancer Res.* 65(23):11044-11050.

Choti MA (2004) Adjuvant therapy for pancreatic cancer – the debate continues. *N Engl J Med* 350:1249-1251.

De Angelis C, Repici A, Carucci P, Bruno M, Goss M, Mezzabotta L, Pellicano R, Saracco G, Rizzetto M (2007) Pancreatic Cancer Imaging: The New Role of Endoscopic Ultrasound. *JOP. J Pancreas (Online)*; 8(1 Suppl.):85-97.

Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman M, Lu H, Knebelman B, Segal M, Sukhatme VP (1999) Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 274:1172-11726.

Eder JP Jr, Supko JF, Clark JW, Puchalski TA, Garcia-Carbonero R, Ryan DP, Shulman LN, Proper J, Kirvan M, Rattner B, Connors S, Keogan MT, Janicek MJ, Fogler WE, Schnipper L, Kinchla N, Sidor C, Phillips E, Folkman J, Kufe DW (2002) Phase I clinical trial of recombinant human Endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. *J Clin Oncol.* 20(18):3772-3784.

Ellis LM, Fidler IJ (1996) Angiogenesis and metastasis. *European Journal of Cancer* 32A:2451-2460.

Fidler IJ, Ellis LM (1994) The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79:185-188.

Flanagan J (1966) Nude, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Gene. Res.* 8(3):295-309.

Folkman J (1976) The vascularization of tumors. *Sci Am.* 234(5):58-64, 70-73.

Folkman J (1995) *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston.* Clinical applications of research on angiogenesis. *N Eng J Med* 333:1757-1763.

Folkman J (1996) New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur.J.Cancer* 32a:2534-2539.

Folkman J (1997) Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS* 79:1-8.

Folkman J (1998) Antiangiogenic gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(16):9064-9066.

Folkman J (2006) Anti-angiogenesis in cancer therapy – endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res* 312(5):594-607.

Hanahan D, Folkman j (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 88:277-285.

Hanai J, Gloy J, Karumanchi SA, Kale S, Tang J, Hu G, Chan B, Ramchandran R, Jha V, Sukhatme VP, Sokol S (2002) Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signalling. *J Cell Biol*. 158(3):529-539.

Hansma AHG, Broxterman HJ, van der Horst I, Yuana Y, Boven E, Giaccone G, Pinedo HM, Hoekman K (2005) Recombinant human endostatin administered as a 28-day continuous intravenous infusion, followed by daily subcutaneous injections: a phase I and pharmacokinetic study in patients with advanced cancer. *Annals of Oncology* 16(10):1695-1701.

Harris AL (1997) Anti-angiogenesis for cancer therapy. *Lancet* 349 Suppl2:SII13-15.

Heinemann V, Allescher HD, Busch M, Heiss MM, Helmberger T, Krämling HJ, Lersch C, Roder JD, Schalhorn A, Schoenberg MH, Waldner H, Wiebecke B, Zimmermann F (2001) Karzinome des exokrinen Pankreas. *MANUAL Gastrointestinale Tumoren by Tumorzentrum München* 181-196.

Heljasvaara R, Nyberg P, Luostarinen J, Parikka M, Heikkila P, Rehn M, Sorsa T, Salo T, Pihlajaniemi T (2005) Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp Cell Res*. 307:292-304.

Hirschhorn R, Vawter GF, Kirkpatrick JA (1979) Adenosine deaminase deficiency Frequency and comparative pathology in autosomal recessive severe combined immunodeficiency. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 14(1):107-120.

Hotz HG, Reber HA, Hotz B, Foitzik T, Buhr HJ, Cortina G, Hines OJ (2001) An improved clinical model of orthotopic pancreatic cancer in immunocompetent Lewis rats. *Pancreas* 22(2):113-121.

Hotz HG, Reber HA, Hotz B, Yu T, Foitzik T, Buhr HJ, Cortina G, Hines OJ (2003) An orthotopic nude mouse model for evaluating pathophysiology and therapy of pancreatic cancer. *Pancreas* 26(4):e89-98.

Jensen HA, Nielsen HO, Jensen JD, Fristrup CW, Nielsen M, Pfeiffer P (2008) Treatment of unresectable locally advanced pancreatic cancer with combined radiotherapy and chemotherapy, *Ugeskr Laeger* 170(8):639-41.

Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B, Dhanabal M, Hanai JI, Venkataraman G, Shriver Z, Keiser N, Kalluri R, Zeng H, Mukhopadhyay D, Chen RL, Lander AD, Hagihara K, Yamaguchi Y, Sasisekharan R, Cantley L, Sukhatme VP (2001) Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol Cell*. 7(4):811-822.

Kato H, Ishikura H, Kawarada Y, Furuya M, Kondo S, Kato H, Yoshiki T (2001) Anti-angiogenic treatment for peritoneal dissemination of pancreas adenocarcinoma: a study using TNP-470. *Jpn J Cancer Res*. 92(1):67-73.

Kerbel RS (2006) Antiangiogenic Therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science* 312:1171-1175.

Keshet E, Ben-Sasson SA (1999) Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. *J.Clin.Invest*. 104:1497-1501.

Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Gho YS, Kwon YG (2002) Endostatin Blocks Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Signaling via Direct Interaction with KDR/Flk-1. *J. Biol. Chem*. 277:27872-27879.

Klöppel G, Maillet B (1996) Pathomorphology of ductal pancreatic cancer. *Cancer of Pancreas* 33-46.

Kubota T (1994) Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem*. 56:4-8.

Kulke MH, Bergsland EK, Ryan DP, Enzinger PC, Lynch TJ, Zhu AX, Meyerhardt JA, Heymach JV, Fogler WE, Sidor C, Michelini A, Kinsella K, Venook AP, Fuchs CS (2006) Phase II study of recombinant human Endostatin in patients with advanced neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol.* 24(22):3555-3561.

Kuo CJ, LaMontagne KR Jr, Garcia-Cardena G, Ackley BD, Kalman D, Park S, Christofferson R, Kamihara J, Ding YH, Lo KM, Gillies S, Folkman J, Mulligan RC, Javaherian K. (2001) Oligomerization-dependent regulation of motility and morphogenesis by the collagen XVIII NC1/endostatin domain. *J Cell Biol.* 152(6):1233-1246.

La Vecchia C, Boyle P, Franceschi S, Levi F, Maisonneuve P, Negri E, Lucchini F, Smans M (1991) Smoking and cancer with emphasis on Europe. *Eur J Cancer* 27:94-104.

Lin HC, Chang JH, Jain S, Gabison EE, Kure T, Kato T, Fukai N, Azar DT (2001) Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:2517-24.

Ling Y, Yang Y, Lu N, You QD, Wang S, Gao Y, Chen Y, Guo QL (2007) Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 361(1):79-84.

MacDonald NJ, Shivers WY, Narum DL, Plum SM, Wingard JN, Fuhrmann SR, Liang H, Holland-Linn J, Chen TDH, Sim KLB (2001) Endostatin binds Tropomyosin: A potential modulator of the antitumor activity of Endostatin. *J. Biol. Chem.* 276:25190-25196.

MacDougall JR, Croy BA, Chapeau C, Clark DA (1990) Demonstration of a splenic cytotoxic effector cell in mice of genotype SCID/SCID.BG/BG. *Cell Immunol.* 130(1):106-117.

McGuire T, Banks K, Poppie M (1975) Animal models of human disease Combined immunodeficiency in horses. *Am J. Pathol.* 80:551-554.

Miller RD, Hogg J, Ozaki JH, Gell D, Jackson SP, Riblet R (1995) Gene for the catalytic subunit of mouse DNA-dependent protein kinase maps to the scid locus. *Proc Natl Acad Sci* 92:10792-10795.

Miosge N, Sasaki T, Timpl R (1999) Angiogenesis inhibitor endostatin is a distinct component of elastic fibers in vessel walls. *FASEB J* 13:1743-1750.

Mohammad RM, Dugan MC, Mohamed AN, Almatchy VP, Flake TM, Dergham ST, Shields AF, Al-Katib AA, Vaitkevicius VK, Sarkar FH (1998) Establishment of a human pancreatic tumor xenograft model: potential application for preclinical evaluation of novel therapeutic agents. *Pancreas* 16(1):19-25.

Moore PS, Sipos B, Orlandini S et al. (2001) Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* 439:798-802.

Muragaki Y, Timmons S, Griffith CM, Oh SP, Fadel B, Quertermous T, Olsen BR (1995) Mouse Coll8a1 is expressed in a tissue-specific manner as three alternative variants and is localized in basement membrane zones. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(19):8763-8767.

Murr MM, Sarr MG, Oishi AJ, van Heerden JA (1994) Pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 44: 304-318.

Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Crus L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Büchler MW, for the European Study Group for Pancreatic Cancer (2004) A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 350:1200-1210.

Neri D, Bicknell R (2005) Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer* 5(6):436-446.

Nieder C, Wiedenmann N, Andratschke N, Molls M (2006) Current status of angiogenesis inhibitors combined with radiation therapy. *Cancer Treat Rev* 32(5):348-64.

Okabe T, Yamaguchi N, Ohsawa N (1983) Establishment and characterization of a carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cell line from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Cancer* 51:662-668.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:277-285.

Pepper MS (1997) Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 17:605-619.

Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V (1995) Gemcitabine: metabolism, mechanism of action, and self-potential. *Semin Oncol.* 22:3-10.

Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, Nakamura H, Ilmonen M, Lombardo CR, Pihljaniemi T, Alitalo K, Vuori K (2001) Interactions of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *PNAS* 98(3):1024-1029.

Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Broschüre „ Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends, 6. überarbeitete Auflage, 2008.

Rygaard J (1969) Immunobiology of the mouse mutant Nude. Preliminary investigations. *Acta Pathol Microbiol Scand* 77(4):761-762.

Saif MW (2006) Review: Anti-Angiogenesis therapy in pancreatic carcinoma. *JOP.J Pancreas (Online)* 7(2):163-173.

Sipos B, Möser S, Kalthoff H, Török V, Löhr M, Klöppel G (2003) A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch* 442:444-452.

Schniewind B, Heintz K, Kurdow R, Ammerpohl O, Trauzold A, Emme D, Dohrmann P, Kalthoff H (2006) Combination phenylbutyrate/gemcitabine therapy effectively inhibits in vitro and in vivo growth of NSCLC by intrinsic apoptotic pathways. *Journal of Carcinogenesis* 5:25.

Schniewind B, Groth S, Sebens Muerköster S, Sipos B, Schäfer H, Kalthoff H, Fändrich F, Ungefroren H (2007) Dissecting the role of TGF-beta type I receptor/ALK5 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Smad activation is crucial for both the tumor suppressive and prometastatic function. *Oncogene* 26(33):4850-62.

Schuler W, Bosma MJ (1989) Nature of the scid defect: VDJ recombinase system. *Curr Top Microbiol Immunol.* 152:55-62.

Storniolo AM, Enas NH, Brown CA, Voi M, Rothenberg ML, Schilsky R (1999) An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 85:1261-1268.

Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M, Kalluri R (2003) Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8): 4766–4771.

Tepel J, Kruse ML, Kapischke M, Haye S, Sipos B, Kremer B, Kalthoff H (2006) Adjuvant treatment of pancreatic carcinoma in a clinically adapted mouse resection model. *Pancreatology.* 6(3):240-7.

Tomayko MM, Reynolds CP (1989) Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 24(3):148-154.

Tozer GM, Kanthou C, Baquley BC (2005) Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* 5(6):423-35.

Tsuzuki Y, Carreira CM, Bockhorn M, Xu L, Jain RK, Fukumura D (2001) Pancreas microenvironment promotes VEGF expression and tumor growth: novel window models for pancreatic tumor angiogenesis and microcirculation. *Lab Invest* 81:1439-1451.

Weidner M, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N.Engl.J. Med.* 324:1-8.

Wen W, Moses MA, Wiederschain D, Arbiser JL, Folkman J (1999) The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Research* 59:6052-6056.

Whitworth A (2006) Endostatin: Are we waiting for godot? Journal of the National Cancer Institute 98:731-733.

Wray CJ, Ahmad SA, Matthews JB, Lowy AM (2005) Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice. Gastroenterology 128:1626-1641.

Wu Y, Yang L, Hu B, Liu JY, Su JM, Luo Y, ding, ZY, Niu T, Li Q, Xie XJ, Wen YJ, Tian L, Kan B, Mao YQ, Wei YQ (2005) Synergistic anti-tumor effect of recombinant human Endostatin adenovirus combined with gemcitabine. Anticancer Drugs. 16(5):551-557.

Xu F, Ma Q, Sha H (2007) Optimizing drug delivery for enhancing therapeutic efficacy of recombinant human endostatin in cancer treatment. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 24(5):445-92.

7. Anhang

7.1. Labormaterialien und Arbeitsgeräte

Auslaufpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml), Sarstedt, Nümbrecht

Auslaufpipetten (2 ml, 1 ml) Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen

Cryo Mbed, Bright Instrument Company, Huntingdon, Großbritannien

Einmalspritze, 1 ml, Becton Dickinson, Heidelberg

Filterdeckel, Porengröße 0,2 µm, Becton Dickinson, Heidelberg

Gefrierschrank (-80°C) GFL Typ 6385, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Gefrierschrank (-20°C), Liebherr, Ochsenhausen

Insulinspritzen U-100, 0,3 ml, 29 GA x ½, 0,33 x 13 mm, Becton Dickinson, Heidelberg

Kanülen 27 GA 0,4 x 19, Becton Dickinson, Heidelberg

Kryo-Röhrchen, Cryo.s, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen

Kryo-Röhrchen, Cryo Tubes, Nunc, Intermed GmbH, Wiesbaden

Kryotom, 2700-Frigocut, Reichert-Jung, Nussloch

Kryotom, Mikrostatt-Kryotom HM 500 OM, Micron Laborgeräte, Walldorf

Kulturflaschen mit Filterdeckel (0,2 µm Porengröße), Sarstedt, Newton, USA

Mikroskop Olympus BX45TF, Olympus Corporation Tokio, Japan

Objektträger Super Frost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig

Objektträger, Menzel-Gläser, Braunschweig

Pasteurpipetten (230 mm), Assistant, Karl Hecht Glaswarenfabrik, Sondheim, Röhn

Pipettenspitzen, Sarstedt, Nümbrecht

Präzisionspipetten (1000 µl, 500 µl, 100 µl, 10 µl), Fa. Eppendorf, Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Reagiergefäße Microtubes (1,5 ml), Sarstedt, Nümbrecht

Silikon-Stift PAP-Pen, SCI Sciences Services, München

Staining master-HE-Färbeautomat, Bavimed Laborgeräte, Birkenau

Sterilarbeitsbank, Köttermann 8511, Köttermann GmbH & CoKG, Uetze/Hänigsen

Wasserbad, Typ WB7, Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach

Zählkammer, Fuchs-Rosenthal (Kammertiefe 0,200 mm, 0,0625 mm²), Superior, Deutschland

Zellkulturwärmeschrank, Steri-Cult 200 Incubator, Forma Scientific, Ohio, USA

Zentrifuge, Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Osterode

Zentrifuge, Rotanta 46R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Zentrifugentubes, Eppendorf, Hamburg

7.2. Zellkultur: Medien und Zusätze

Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Darmstadt

Fötale Kälberserum (FCS), Hyclone, Logan, USA

Kochsalzlösung (0,9 %), B. Braun, Melsungen

Matrigel, BD Matrigel TM Basement Membrane Matrigel, growth factor reduced, mouse natural, Becton-Dickinson, Heidelberg

Mykoplasmen Test Kit, Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan

Phosphate Buffered Saline Dulbecco's (PBS), Life Technologies, Eggenstein

Rosewell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 mit Glutamax-I, Life Technologies, Eggenstein

Trypsin/EDTA Solution (10x), 0,5 %/0,2 % (w/v) in (10x) PBS (w/o) Ca²⁺, Mg²⁺ dilute 1:10 mit Aqua bidest, Biochrom AG, Berlin

7.3. Tierstall: Haltungsbedingungen und Arbeitsmaterialien

Einmalrasierer, Kai Medical, Solingen

Einstreu SNIFF (autoklaviert), Spezialdiäten GmbH, Soest

Flaschen 250 ml, Scanbur, Koge, Dänemark

Futter bestrahlt für Ratten und Mäuse, Altromin, Lage

Laminar-Airflow Schrank, Scanbur, Koge, Dänemark

Makrolonkäfige Typ III mit Filtertops, Scanbur, Koge, Dänemark

Sicherheitswerkbank, Animal Laf, Heto-Holten, Alterod, Dänemark

Vicryl 6/0, 0,7 metric, Ethicon, Hamburg

Wasser ohne Kohlensäure, Bismarck, Aumühle

Wundverschlussstreife, Band-Aid, Johnson und Johnson Medical, Norderstedt

7.4. Färbereagenzien und Zubehör

Aceton, Merck, Darmstadt

Alkohol, Merck, Darmstadt

Anti-Mouse CD 31, Immunotech, Marseille, Frankreich

Anti-Ratte sekundäre Antikörper, Z0494, DAKO, Corp. Hamburg

APAAP, Ratte, D0488, DAKO, Corp. Hamburg

Aqua destillata, B.Braun, Melsungen

Deckgläser, Menzel-Gläser, Braunschweig

Depex[®], Boehringer Ingelheim, Heidelberg

Eisessig, Merck, Darmstadt

Eosinpulver, Merck, Darmstadt

Ethanol, Merck, Darmstadt

Hämalaun-Lösung in Ethadiol, Merck, Darmstadt

Kaninchen-Anti-Maus Immunoglobuline (IgG und IgM), Dianova, Hamburg

Leitungswasser, Wasserwerke Kiel

NaCl 0,9%ig (Kochsalzlösung), Merck, Darmstadt

Tris-Base, Sigma Chemical, St. Louis, USA

Tris-HCL, Sigma Chemical, St. Louis, USA

Xylol, Merck, Darmstadt

7.5. Tabellen für die Tiermodelle

7.5.1. Tumorstadien (mm³) PancTu-I in Kulturmedium inokuliert

Tag der Tötung	10	20	25	30	35	41	45
Pankreasvolumen	33,3	104	130	117	168	1258,4	280,8
der einzelnen	23,4	18,7	130	331,2	565,7	205,9	117
Versuchstiere	78	117	104	780	205,9		505,4
	28,1	78	104	254,8	254,8		758,2
	18,7	74,8			926,6		
	14						
Minimum	14	18,7	104	117	168	205,9	117
Maximum	78	117	130	331,2	926,6	1258,4	758,2
Mittelwert	32,6	78,5	117	370,8	424,2	732,2	415,4
Standardabweichung	23,6	37,8	15	286,9	321,9	744,2	278,6
Metastasen	0	0,5	6,2	58,2	4,7	4160	1040
(Bauchdecke) der	4,2	5,2	91	299,5	780	589,7	91
einzelnen	0	0	0	499,2	1		499,2
Versuchstiere	0	0	3,5	1	66,6		1258,4
	0	0,1	66,6	589,7	159,1		
	0						
Mittelwert	4,2	1,9	41,8	289,5	202,3	2374,9	722,2
Standardabweichung	0	2,8	43,9	260,3	329,2	2524,6	528,1

7.5.2. Tumorstadien (mm³) Panc89 in Kulturmedium inokuliert

Tag der Tötung	15	25	35	45
Pankreasvolumen	0,1	1,2	4,3	58,2
der einzelnen	0,1	0,5	5,2	187,2
Versuchstiere	0,01	1,1	1,5	156
	2	1,5	0	572
	0,3	3,4	0	12,5
Minimum	0,01	0,5	1,5	12,5
Maximum	2	3,4	5,2	572
Mittelwert	0,5	1,5	3,7	197,2
Standardabweichung	0,8	1,1	1,9	221,2
Metastasen	0	0,1	1010,9	2340
(Bauchdecke) der	0	0,1	884	2662,4
einzelnen	0	0	99,8	3328
Versuchstiere	0	0	0	2446,1
	0	0	0	2554,8
Mittelwert	0	0,1	664,9	2666,3
Standardabweichung	0	0	493,5	389

7.5.3. Tumorumina (mm³) PancTu-I in Matrigel inokuliert

In jeder Gruppe befanden sich 5 scid-beige Mäuse, die jeweils mit 5×10^5 Zellen der Zelllinie PancTu-I orthotop mit Matrigel inokuliert wurden. Zu dem jeweiligen Tötungszeitpunkt wurde das Tumorumina (mm³ = L x B² x 0,52) für den Primärtumor und die Bauchdeckenmetastasen berechnet.

Tag der Tötung	14	28	42	28	42	28	42	28	42
Behandlung	Unbehandelt			Endostatin (ES)		Gemcitabin (Gemc)		ES und Gemc	
Pankreasvolumen	4,2	78	280,3	58,2	206	0	18,7	0	33,3
der einzelnen Tiere	91	143	780	58,2	280,3	49,9	32,8	33,3	6,2
	78	187,2	299,5	104	104	117	28,1	41,6	14,0
	41,6	205,9	74,9	23,4	465,9	32,8	41,6	9,1	6,2
	18,7	117	68,6	91	65,3	18,7	18,7	18,7	0,5
Minimum	4,2	78	68,6	23,4	65,3	0	18,7	0	0,5
Maximum	91	205,9	780	104	465,9	117	41,6	41,6	33,3
Mittelwert	46,7	146,2	300,7	67	224,3	54,6	28	25,7	12
Standardabweichung	37,3	51,9	289,4	31,6	159,4	43,5	9,8	14,6	12,8
Metastasenvolumen	4,2	0	5,2	83,2	0	4,2	0	0	0
(Bauchdecke) der	0	182	433,2	37,4	0	0,5	0	0	0
einzelnen Tiere	0	0	0	51,5	0	0	0	0	0
	0	6,2	0	0	66,6	0	0	14	0
	0	0	229,3	0	74,9	0	0	6,2	0
Mittelwert	4,2	94,1	222,6	57,4	70,8	2,4	0	10,1	0
Standardabweichung	0	124,3	214,1	23,5	5,9	2,6	0	5,5	0

7.5.4. Blutgefäßdicke (mm²) im PancTu-I Tumor markiert durch Färbung mit Anti-CD 31 Antikörper

Tag der Tötung	14	28	42
Unbehandelte Kontrolltiere	0	67,7	131,0
	43,7	95,3	70,3
	39,7	60,7	59,0
	0	66,0	56,0
	51,3	75,7	43,0
Mittelwert	44,9	73,1	71,9
Standardabweichung	5,9	13,5	30,8
Mit Endostatin behandelte Tiere		34,3	21,7
		50,7	29,7
		63,0	35,7
		38,7	69,0
		27,0	83,0
Mittelwert		42,7	47,8
Standardabweichung		14,2	26,7
Mit Gemcitabin behandelte Tiere		23,3	23,0
		50,0	0
		26,0	26,7
		42,3	31,7
		0	25,3
Mittelwert		35,4	26,7
Standardabweichung		12,9	3,9
Mit Endostatin- und Gemcitabin behandelte Tiere		29,0	14,7
		22,7	34,0
		40,3	25,7
		33,7	0
		28,0	0
Mittelwert		30,7	24,8
Standardabweichung		6,6	9,7

7.5.5. Proliferationsrate (%) im PancTu-I Tumor markiert durch Färbung mit Anti-Ki-67 Antikörper

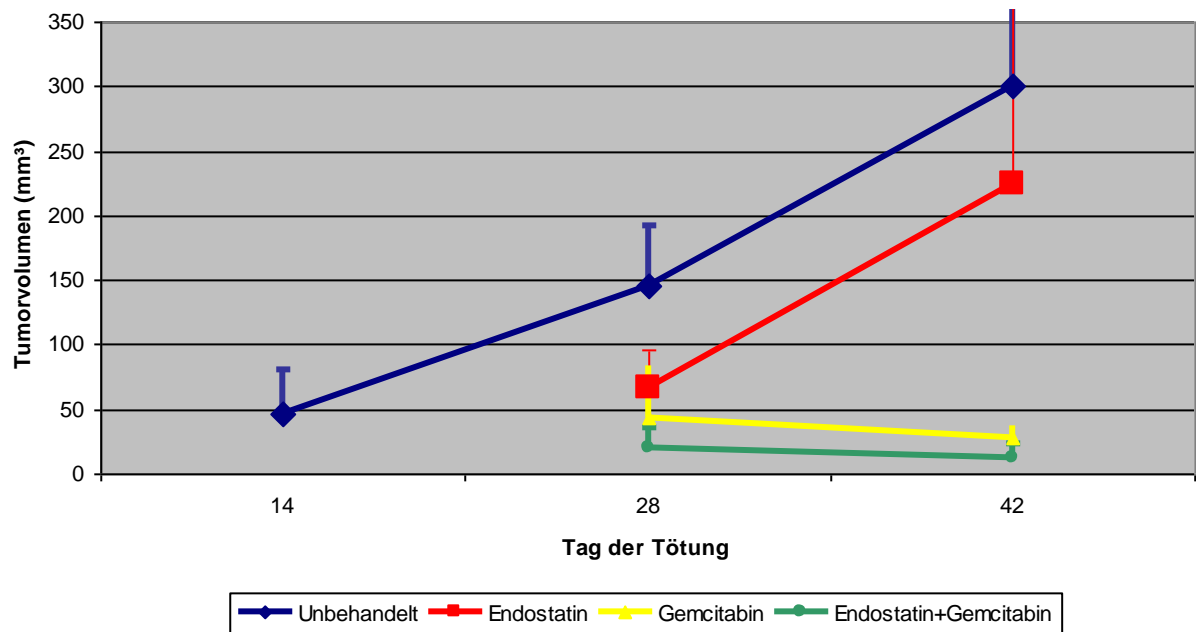
Tag der Tötung	14	28	42
Unbehandelte Kontrolltiere	0	68,7	69,1
	69,0	74,3	75,8
	57,1	77,3	70,8
	62,9	67,9	61,4
	0	74,5	79,9
Mittelwert	63,0	72,5	71,4
Standardabweichung	4,9	3,6	6,3
Mit Endostatin behandelte Tiere		48,7	66,5
		57,4	0
		59,7	69,5
		47,9	73,6
		64,8	74,7
Mittelwert		55,7	71,1
Standardabweichung		6,5	3,3
Mit Gemcitabin behandelte Tiere		51,1	63,7
		52,7	56,3
		59,2	59,8
		48,2	51,9
		30,2	44,3
Mittelwert		48,3	55,2
Standardabweichung		9,7	6,7
Mit Endostatin- und Gemcitabin behandelte Tiere		30,0	45,3
		43,0	59,2
		38,8	0
		48,3	0
		43,8	39,4
Mittelwert		40,8	48,0
Standardabweichung		6,2	8,3

7.5.6. Effektivität der in vivo Luconyl Blau Applikation

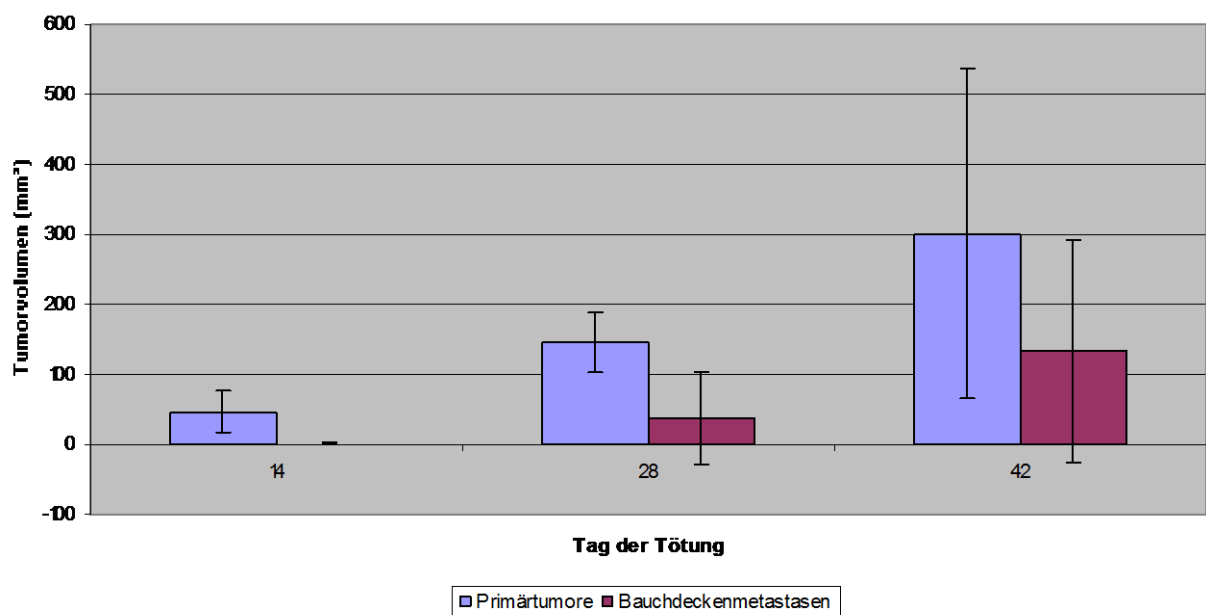
Injektionsort	Tiere insgesamt	Makroskopisch blaufärbte Tiere	Mikroskopisch blaufärbte Tiere
V. portae	6	3	2
Schwanzvene	6	4	4
Intrakardial	81	49	21
Tiere insgesamt	93	56	27

7.6. Diagramme

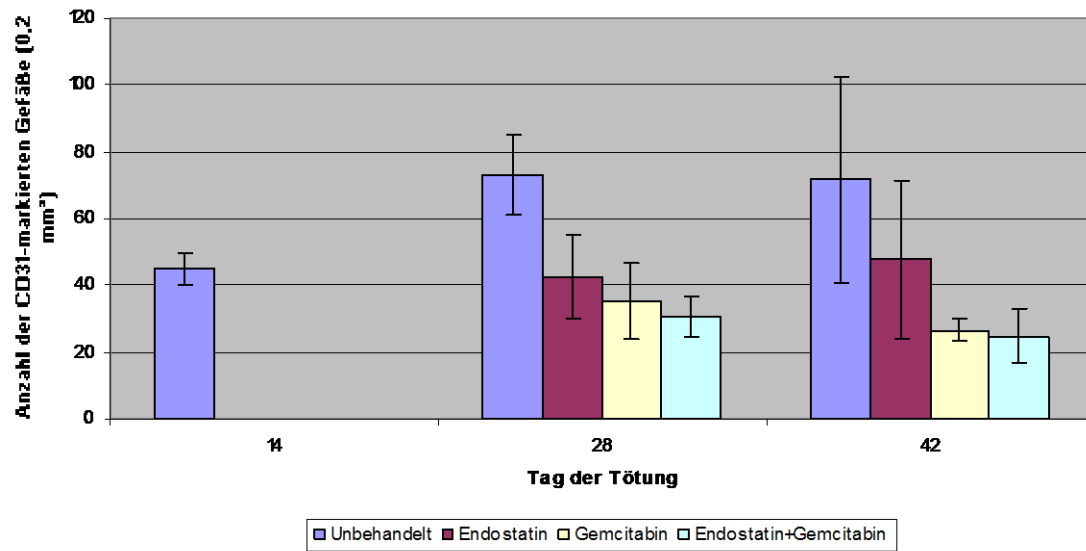
7.6.1. Vergleich der Tumervolumina im Pankreas (behandelt versus unbehandelt) bei PancTu-I Tumoren (Matrigel)



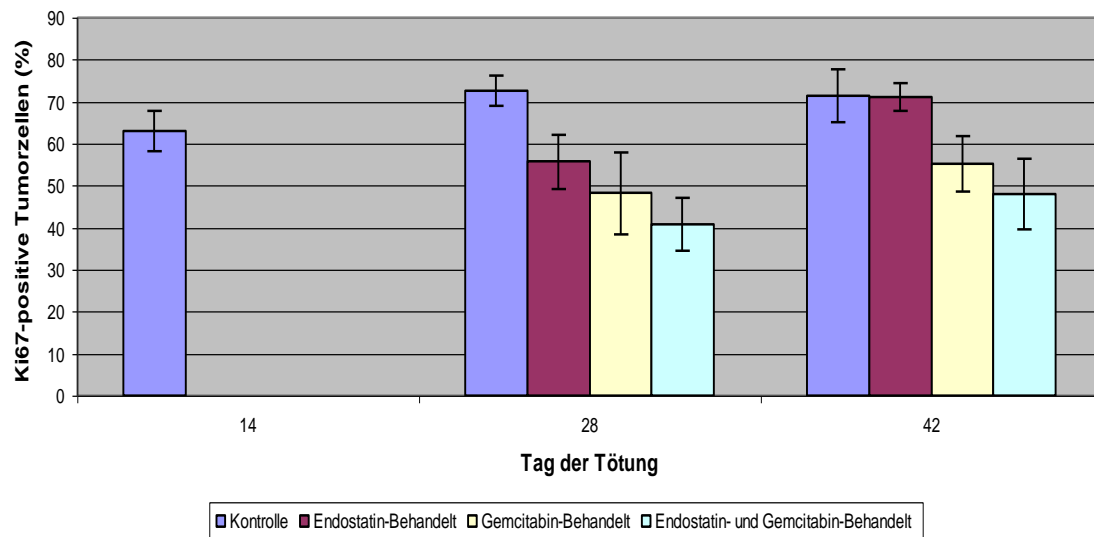
7.6.2. Vergleich der Tumervolumina (Primärtumoren versus Bauchdeckenmetastasen) der PancTu-I Tumoren (Matrigel)



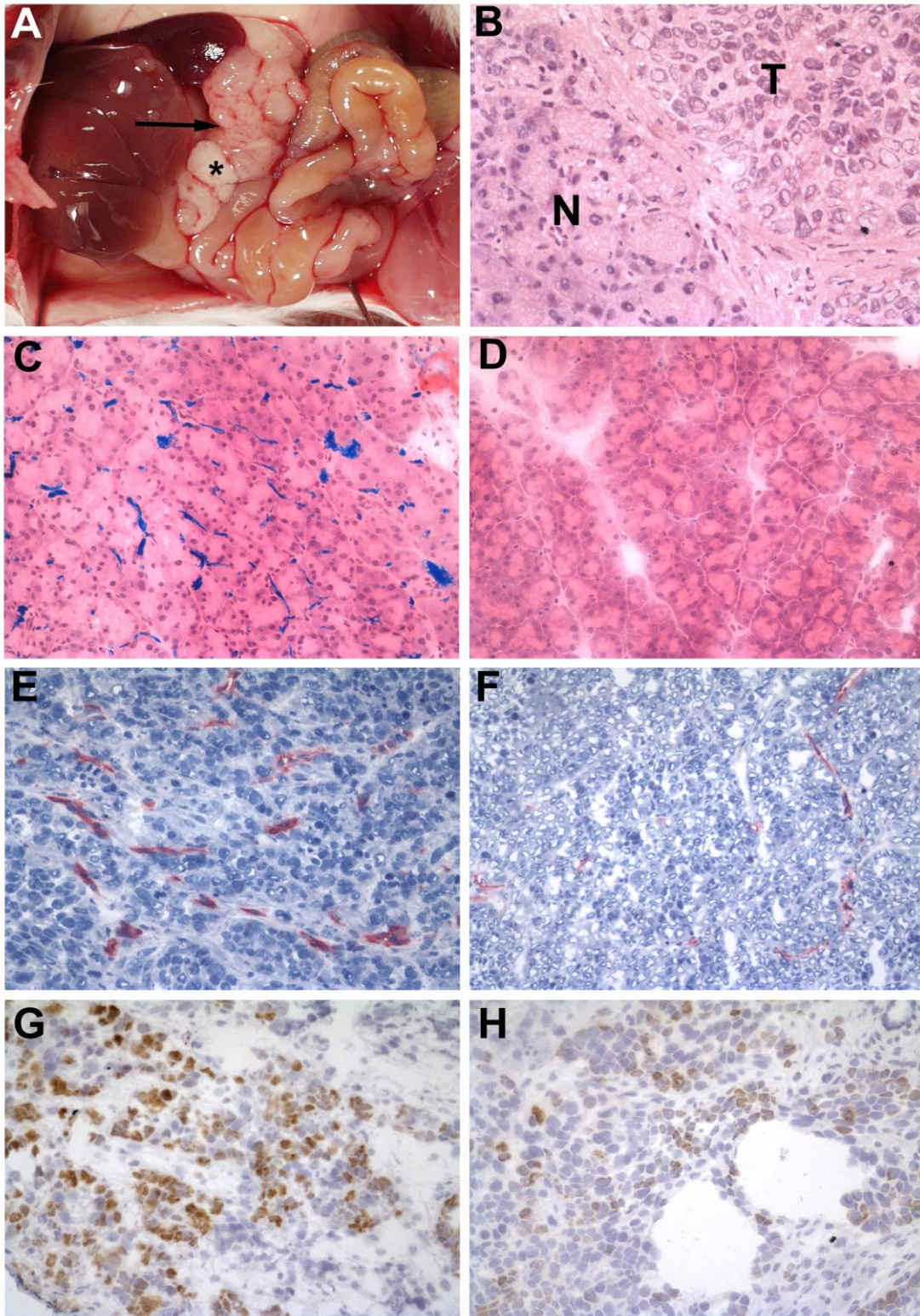
7.6.3. Blutgefäßdichte der PancTu-I Tumoren (CD 31 Färbung)



7.6.4. Proliferationsrate der PancTu-I Tumoren (Ki-67 Färbung)



7.7. Abbildungen



Abbildungen: Pankreaskarzinom im orthotopen Mausmodell

A Intraoperativer Maussitus mit normalem Pankreasgewebe (Pfeil) und Tumorgewebe im Pankreas (Sternchen). **B** Gefrierschnitt von PancTu-I Tumoren in Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung mit Normalgewebe (N) und Tumorgewebe (T) (400x). **C** Gefäßdarstellung nach intrakardialer Injektion mit Luconyl Blau (HE-Färbung 200x) und **D** ohne Farbstoffapplikation (HE-Färbung 200x). **E** Immunhistochemische Analyse der Mikrogefäßdichte im Primärtumor mittels CD 31 Färbung am Tag 28 nach orthotoper Inokulation von PancTu-I mittels Matrigel in der Kontrollgruppe (200x) und **F** nach Kombinations-Behandlung mit Endostatin und Gemcitabin (200x). Die Mikrogefäßdichte in der behandelten Gruppe war signifikant geringer. **G** Immunhistochemische Analyse proliferierender Zellen im Primärtumor mittels Ki - 67 Färbung am Tag 42 nach orthotoper Inokulation von PancTu-I mittels Matrigel in der Kontrollgruppe (200x) und **H** nach Kombinations-Behandlung mit Endostatin und Gemcitabin (200x). Die Proliferationsrate in der behandelten Gruppe war signifikant geringer.

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. G. Klöppel für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung eines wissenschaftlichen Arbeitsplatzes und sein Interesse am Werdegang dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Bence Sipos für seine außerordentlich engagierte und freundschaftliche Betreuung während der gesamten Arbeit sowie für seine Hilfestellung bei der Planung und Ausführung der Versuche. Weiterhin bedanke ich mich für seine unermüdliche Geduld, seine Motivation und sein Vertrauen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. med. vet. Sieglinde Hays und Frau Dr. med. vet. Renata Mendoza für die sehr gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bei den tierexperimentellen Versuchen.

Ich bedanke mich außerdem bei Frau Maike Pacena, Frau Anja Bredtman und Frau Sonja Vollbehr für die Hilfe im Labor, insbesondere bei den immunhistochemischen Färbungen sowie bei allen weiteren Mitarbeitern der Institute für Pathologie und Molekulare Onkologie, die mich freundlich unterstützt haben.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Mutter, meiner Schwester Sonja sowie bei meiner Freundin Bettina für ihre Hilfe, den Rückhalt und die moralische Unterstützung bedanken.

9. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Maren Riechmann
Geburtsdatum	06.10.1971
Geburtsort	Neumünster

Schulbildung

1978 – 1987	Grund- und Hauptschule, Wasbek
1987 – 1989	Berufsfachschule Sozialwirtschaft, Schwerpunkt Gesundheit, Elly-Heuss-Knapp-Schule, Neumünster
1989 – 1992	Fachgymnasium, sozialwirtschaftlicher Zweig Elly-Heuss-Knapp-Schule, Neumünster

Berufsausbildung

1992 – 1995	Staatlich examinierte Krankenschwester Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster
-------------	---

Hochschulbildung

1995	Beginn Humanmedizinstudium
2003	Abschluss 3. Staatsexamen
2004	Approbation als Ärztin Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Berufstätigkeit

2003 – 2006	Assistenzärztin, Abteilung für Chirurgie Kantonsspital Bruderholz, Schweiz
Seit 2006	Assistenzärztin, Abteilung für Chirurgie Klinikum Meiningen